



Internalisation cellulaire et activité biologique de mico et nano-particules fluorescentes de chimie de surface contrôlée.

Lara Leclerc

► To cite this version:

Lara Leclerc. Internalisation cellulaire et activité biologique de mico et nano-particules fluorescentes de chimie de surface contrôlée.. Autre. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2011. Français. NNT : 2011EMSE0635 . tel-00735365

HAL Id: tel-00735365

<https://theses.hal.science/tel-00735365>

Submitted on 25 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



NNT : 2011 EMSE 0635

THÈSE

présentée par

Lara LECLERC

pour obtenir le grade de

Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des procédés

Internalisation cellulaire et activité biologique de micro et nano-particules fluorescentes de chimie de surface contrôlée

soutenue à Saint-Etienne, le 13 décembre 2011

Membres du jury

Président :	Olivier TILLEMENT	Professeur des universités, Université de Lyon
Rapporteurs :	Sophie LANONE	Chargée de Recherche, Inserm, Université de Paris
	Olivier TILLEMENT	Professeur des universités, Université de Lyon
Examineur :	Peter BARLOW	Assistant Professor, Napier University
Directeurs de thèse :	Didier BERNACHE	Professeur, Ecole des Mines de Saint-Etienne
	Michèle COTTIER	Professeur des universités, CHU de Saint-Etienne
	Philippe GROSSEAU	Directeur de Recherche, Ecole des Mines de Saint-Etienne
Invité :	Jérémy POURCHEZ	Chargé de Recherche, Ecole des Mines de Saint-Etienne

Spécialités doctorales :

SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX
 MECANIQUE ET INGENIERIE
 GENIE DES PROCEDES
 SCIENCES DE LA TERRE
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES
 INFORMATIQUE
 IMAGE, VISION, SIGNAL
 GENIE INDUSTRIEL
 MICROELECTRONIQUE

Responsables :

J. DRIVER Directeur de recherche – Centre SMS
 A. VAUTRIN Professeur – Centre SMS
 F. GRUY Professeur – Centre SPIN
 B. GUY Maître de recherche – Centre SPIN
 J. BOURGOIS Professeur – Fayol
 E. TOUBOUL Ingénieur – Fayol
 O. BOISSIER Professeur – Fayol
 JC. PINOLI Professeur – Centre CIS
 P. BURLAT Professeur – Fayol
 Ph. COLLOT Professeur – Centre CMP

Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

AVRIL	Stéphane	MA	Mécanique & Ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	MA	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
BENABEN	Patrick	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
BERNACHE-ASSOLLANT	Didier	PR 0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean-Pierre	MR	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaïd	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR 1	Informatique	Fayol
BORBELY	Andras	MR	Sciences et Génie des Matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	MA	Génie Industriel	Fayol
BOUDAREL	Marie-Reine	PR 2	Génie Industriel	DF
BOURGOIS	Jacques	PR 0	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
BRODHAG	Christian	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
BURLAT	Patrick	PR 2	Génie industriel	Fayol
COLLOT	Philippe	PR 1	Microélectronique	CMP
COURNIL	Michel	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR 1	Génie industriel	CMP
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DECHOMETTS	Roland	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
DESRAYAUD	Christophe	MA	Mécanique & Ingénierie	SMS
DELAFOSSSE	David	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR 1	Génie Industriel	Fayol
DRAPIER	Sylvain	PR 2	Mécanique & Ingénierie	SMS
DRIVER	Julian	DR 0	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FEILLET	Dominique	PR 2	Génie Industriel	CMP
FOREST	Bernard	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CIS
FORMISYN	Pascal	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR	Sciences de la terre	SPIN
GIRARDOT	Jean-Jacques	MR	Informatique	Fayol
GOEURIOT	Dominique	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
GROSSEAU	Philippe	MR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	MR	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GUYONNET	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
HERRI	Jean-Michel	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
INAL	Karim	PR 2	Microélectronique	CMP
KLÖCKER	Helmut	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
LERICHE	Rodolphe	CR CNRS	Mécanique et Ingénierie	SMS
LI	Jean-Michel	EC (CCI MP)	Microélectronique	CMP
MALLIARAS	George Grégory	PR 1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	MA	Mécanique et Ingénierie	SMS
MONTHEILLET	Frank	DR 1 CNRS	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
PERIER-CAMBY	Laurent	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean-Charles	PR 0	Image, Vision, Signal	CIS
ROUSTANT	Olivier	MA	Mathématiques Appliquées	Fayol
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
SZAFNICKI	Konrad	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
THOMAS	Gérard	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
TRIA	Assia		Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean-Paul	MR	Génie des procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR 1	Génie industriel	CIS

Glossaire :

PR 0	Professeur classe exceptionnelle
PR 1	Professeur 1 ^{ère} classe
PR 2	Professeur 2 ^{ème} classe
MA(MDC)	Maître assistant
DR	Directeur de recherche
Ing.	Ingénieur
MR(DR2)	Maître de recherche
CR	Chargé de recherche
EC	Enseignant-chercheur
IGM	Ingénieur général des mines

Centres :

SMS	Sciences des Matériaux et des Structures
SPIN	Sciences des Processus Industriels et Naturels
Fayol	Institut Henri Fayol
CMP	Centre de Microélectronique de Provence
CIS	Centre Ingénierie et Santé

A ma famille

Il vaut mieux savoir tout chercher que chercher à tout savoir.
[P. Mendelson]

REMERCIEMENTS

Ce mémoire marque l'aboutissement de mes travaux de thèse ainsi que la fin de mes études (enfin !!!). L'écriture des remerciements est pour moi très certainement l'exercice le plus difficile que j'aurai eu à réaliser au cours de ces trois années... J'espère qu'à travers ces quelques lignes chacun se retrouvera en espérant sincèrement n'oublier personne, car j'ai eu la chance de travailler au cours de ces travaux avec un grand nombre de personnes formidables.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail de doctorat. Merci au Professeur Olivier Tillement pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse ainsi que d'avoir été rapporteur de ce travail. Merci à madame Sophie Lanone pour avoir accepté de juger ces travaux et d'en avoir été rapporteur. Enfin merci au Professeur Peter G Barlow d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'avoir fait le déplacement depuis Edinburgh.

De par le caractère interdisciplinaire de ces travaux, j'ai eu de nombreux « chefs » que je souhaite remercier tout particulièrement.

Un grand merci en priorité à mes trois directeurs de thèse.

Merci au Professeur Didier Bernache-Assollant, pour la confiance que vous m'avez accordée et pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat dans la prestigieuse Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

Merci aussi à Philippe Grosseau d'avoir suivi mes travaux en me laissant une grande liberté.

Enfin un grand MERCI au Professeur Michèle Cottier, ma directrice de thèse côté Faculté de Médecine - Université Jean Monnet. Malgré votre activité hospitalière mais aussi de recherche et d'enseignement, vous m'avez toujours supervisée avec une admirable rigueur scientifique. Je vous remercie pour votre soutien et vos conseils avisés tout au long de ces travaux de thèse.

C'est avec regret que je quitte cette belle équipe passionnante récemment labellisée qu'est le LINA.

Merci au docteur Jérémie Pourchez, mon co-encadrant officiel aux Mines pour sa vision bien à lui de la biologie mais surtout pour ses compétences physico-chimiques et nos nombreux débats principalement sur le raisonnement en nombre, en masse ou en surface... « C'est pas faux mais pas pertinent !!! ». Je retiendrai surtout la fameuse « tope ». Oui vous savez ce petit animal aveugle qui creuse des trous dans la terre... Mais le meilleur reste encore le jambonneau !!! (Deutsche qualität). J'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de retourner en manger en Allemagne !!! J'espère aussi que nous retournerons en Ecosse finir de goûter les 200 types de whisky proposés sur la carte du bar !!! Trêve de plaisanteries, tu es un chercheur passionné et j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et échanger avec toi au cours de ces trois années. Ta grande motivation est un moteur puissant et stimulant pour toute l'équipe.

Un immense MERCI (qui ne suffit d'ailleurs pas) au docteur Delphine Boudard, ma co-encadrante non officielle mais néanmoins indispensable et d'une grande efficacité à la Fac. Tu as toujours été pour moi de très bon conseils avec ton œil bionique avisé, tes compétences et ta rigueur scientifique m'ont permis d'améliorer sans cesse mes travaux. Tu as toujours été pour moi

d'un très grand soutien surtout dans les moments difficiles. Je te souhaite de trouver enfin tout le bonheur que tu mérites !!! Bon sinon « mamie » je vais arrêter avant de pleurer et me « remuer la papillote »... Sans oublier le fameux braveurt... Quoi ??? Ah braveheart !!! J'ai beaucoup aimé travailler avec toi et tes petites manies (café dilué au 1/5°, chocolat extra noir coupé en mini morceaux...) vont je pense finir par me manquer !!! Mais je ne me fais pas trop de souci car nous aurons sans aucun doute de nombreuses occasions pour nous revoir.

Un grand merci aussi à Princesse (Melle Forest) qui a rejoint l'équipe au cours de ma thèse et qui m'a apportée une aide très précieuse pour la finalisation de mes articles et de mon manuscrit. Tes conseils avisés et ta maîtrise de l'anglais ont été pour moi d'une grande aide !!! Je te souhaite bon courage pour la suite (surtout avec David ton co-bureau adorable et tellement distingué...). Vous formez un couple très improbable mais j'ai un peu l'impression qu'ils font exprès dans cette école... C'est la Deutsche qualität !!! Enfin j'espère aussi que tu trouveras chaussure à ton pied et pourquoi pas au cours d'un concert philharmonique... Qui sait...

Après les grands et petits chefs, je souhaite maintenant remercier les différentes personnes de la Faculté de médecine où j'ai passé environ 80% de mon temps au cours de cette thèse.

Je vais bien entendu commencer par notre équipe, le LINA et notre technicienne de choc Melle Valérie !!! Maman de substitution très attentionnée !!! Je pense maintenant savoir faire un plan de plaque... Enfin j'espère mais quoiqu'il en soit nous avons toujours fini par nous comprendre !!! Et c'est l'essentiel !!! Malgré les moments difficiles tu as toujours retrouvé ton sang froid et tu m'as beaucoup aidé !!! Comme le dit souvent Jérémie, un labo ne tourne pas sans technicien et sans doctorants et nous avons à mon sens formé une très bonne équipe toute les deux et c'est ce qui nous a permis de progresser !!! Je te remercie du fond du cœur pour ces moments partagés (en particulier les coupes de champagne !!!), et tu vas énormément me manquer. Je compte sur toi pour maintenir à flot les petits nouveaux !!!

Merci aussi aux doctorants de l'équipe.

Tout d'abord Melle Pailleux !!!! Ma co-thésarde ou quelque chose comme ça. Je pense que nous avons formé une bonne équipe dans le sens où grâce à toi je n'ai eu aucun mal à m'intégrer avec les gens de l'école et plus particulièrement ceux du bâtiment C, et j'espère avoir facilité tes échanges avec ceux de la fac !!! Quoi qu'il en soit j'ai adoré faire des manips avec toi et en chanson s'il vous plaît car nous sommes des professionnelles du Karaoké (enfin surtout toi !!!). Et puis cette bonne semaine de remise en forme en Tunisie !!! A mon sens nécessaire à la survie d'un thésard !!! Vive les crêpes !!! Mais j'ai beau essayé je ne serai jamais aussi bronzée que toi !!! Bon courage pour ta dernière ligne droite, le plus dur est déjà fait, reste juste à mon sens le plus stressant mais je suis sûre que tu vas t'en sortir comme une « vraie princesse » digne de ce rang !!!

Jean-Philippe. Toujours de bonne humeur et souriant, tu travailles sur une thématique très sympathique qui nous a valu de bons fou rires !!! Le plus mémorable provenant d'un portoir de tubes alors que tu arrivais en retard pour une réunion... En tout cas encore merci et bravo pour ta thèse d'exercice (ils sont quand même fous ces médecins !!!). Bon courage pour la thèse de science mais je ne me fais pas de souci pour toi !!!

Merci aussi à Gabriele, grâce à toi j'ai eu l'occasion de découvrir le bloc opératoire : papa – maman, après ma thèse de sciences je veux devenir chirurgien !!! Non je blague je ne tiendrai pas 10 ans de plus sur les bancs de la fac !!! En tout cas bon courage pour ta thèse de sciences.

Merci aussi à notre brésilienne favorite Iolanda !!! Un grain de folie et un charmant sourire !!! Je te souhaite beaucoup de bonheur ma belle pour la suite !!!

Enfin bon courage aux nouvelles recrues Agathe et Andréa. J'espère que tout se passera bien pour vous mais là encore je ne me fais pas de souci !!!

Je tiens maintenant à remercier l'ensemble du laboratoire BiiGC dirigé par le Professeur Gain et le Professeur Thuret, avec qui nous avons cohabités durant toute ma thèse. Malgré quelques chamailleries j'ai eu un très grand plaisir à travailler dans les mêmes locaux que vous !!!

Plus particulièrement Simone, ton investissement au sein de cette équipe avec une grande rigueur et détermination est à mon sens ce qui vous permet d'avancer. Merci pour ton aide précieuse et tes bons conseils techniques tout au long de mes travaux.

Je pense ensuite aux anciens doctorants avec lesquels j'ai débuté !!!

Mon maître Jedi Aurélien !!! Sans toi je n'aurais jamais su comment boucher mes tubes de cytométrie... Vive le Saran !!! Merci de m'avoir enseigné tout ces petits trucs indispensables. Tu es parti avant que je ne termine, au début de ma dernière année en me laissant seule avec ma rédaction de manuscrit... Heureusement tu avais laissé le tien pour que je m'en inspire. Je regrette profondément de ne pas avoir pu assister à ta soutenance (congrès oblige) et je te souhaite tout le bonheur que tu mérites aussi bien dans ta vie professionnelle que personnelle !!! Enfin j'espère que l'élève n'a pas déçu son maître et que ta « jeune padawan » mérite maintenant son rang de Jedi !!!

Et bien sur mon petit chinois !!! Zhiguo (ou plutôt chi-guo), co-bureau pendant quatre ans. Je n'ai toujours pas compris quels horaires tu faisais ??? 11h – 2h du matin ??? Et Week-end compris ??? Avec en tout et pour tout trois semaines de vacances en quatre ans ??? Moi je dis qu'ils sont forts ces chinois !!! Outre ton acharnement au travail tu es par ailleurs un artiste extrêmement doué aussi bien dans le domaine de la peinture que dans le domaine de la cuisine. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite et te félicite encore pour ta thèse Dr He !!! Je suis très fière de toi !!! C'était une très belle soutenance !!!

Mais désolée pour les autres, au BiiGC ma préférée c'est Nini !!! Major de promo ex-æquo en M2 !!! Notre destin était déjà tout tracé !!! J'ai toujours été très impressionnée par ta capacité de travail, mener de front ton M2 avec tes études de médecine, puis ta thèse d'exercice et maintenant une thèse de science (qui l'eu cru...) en parallèle de ton poste de chef de clinique et tes activités de chirurgien... Wahou !!! T'es trop forte !!! Moi je passe pour une amatrice avec mon PhD... Je suis sûre que ce qui t'aide à tenir commence par la lettre « F », en tout cas quel bon délire Melle Hercule Poireautte. Tu n'auras pas le temps de me manquer car nous allons rester en contact c'est certain !!! Notre passion commune pour la gourmandise étant plus forte que tout on va bien aller se faire un resto un de ces quatre !!!

Arrivent ensuite les petits nouveaux :

Aurélien (Hey !!! Mais que voilà...) et Binh Minh qui signent pour une thèse (bande de fous !!!).

Chaker qui marche sur les pas de Nelly. Ah ces médecins ils aiment la recherche quand même...
Suivi par Olivier (pardon Didier...).

Vous avez apporté une dynamique toute nouvelle au laboratoire bien qu'un peu envahissante...
lol. Une bonne bande de joyeux lurons avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler !!! Merci de m'avoir fait rire au cours de la délicate étape de rédaction. Vous m'avez aidé avec vos blagues (nulles il faut se le dire...). Vous allez me manquer...

Mais sorti de notre laboratoire (LINA-BiiGC), je tiens aussi à remercier plusieurs personnes à l'UJM.

En particulier Odile Sabido, merci de m'avoir fait découvrir la CMF et pour tous tes conseils techniques avisés. Mais un grand merci aussi pour toutes nos discussions sur la recherche d'une manière beaucoup plus large. J'ai appris avec toi de nombreuses choses qu'on ne trouvera jamais dans les livres. Tu m'as fait évoluer et tu m'as vu grandir depuis mes premiers pas dans la recherche. J'espère profondément que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble par la suite.

Merci aussi à Sabine Palle. Ton assistance indispensable en microscopie confocale a de plus été rendue très agréable par ta bonne humeur (bon ok sauf en hiver à cause de la neige...). J'ai eu grand plaisir à te rejoindre à chacune de mes manip malgré les aléas liés à l'informatique et au matériel. Les longues acquisitions de piles d'images nous permettaient d'aller en « griller une petite », ce qui n'était pas déplaisant même si je suis fière d'avoir maintenant arrêtée.

Merci aussi aux nombreuses autres personnes au sein des labos de la Fac, Alain, Marion, Julien, Pauline, Rachel, Hind, Fabrice...

Merci aussi aux collègues de la SCO plus particulièrement Marie et Françoise pour avoir égayé les pauses de midi avec d'agréables fous rires.

Je souhaite maintenant remercier ma deuxième famille d'accueil au cours de cette thèse : L'Ecole des Mines et plus particulièrement le bâtiment C de l'école !!! Même si je n'ai pas été très présente dans les locaux au cours de ces trois années, vous m'avez toujours accueillie avec une extrême gentillesse !!! C'était toujours un grand plaisir de voir chacun d'entre vous au cours de mes souvent brefs passages.

Je souhaite remercier tout particulièrement Françoise, ma maman de substitution à l'école !!! Je ne sais pas comment le CIS fonctionnerait sans toi... Tu gères avec une efficacité hallucinante TOUT !!! Des commandes, aux déplacements en passant par les réservations, etc... Tu es toujours disponible pour chacun d'entre nous et nous facilite la vie à un point que tu ne peux même pas imaginer !!! Je parle en connaissance de cause puisque j'ai trop souvent vu mes collègues doctorants de la Fac perdre un temps fou sur des questions administratives. J'espère que les doctorants du CIS se rendent compte de la chance qu'ils ont de t'avoir !!! En tout cas je suis toujours passée te voir avec grand plaisir, entre nos pauses clope (maintenant révolues !!!) et les tirages de cheveux en particulier pour le congrès Nanotox à Edinburgh... Un très grand MERCI !!!

J'ajoute que vous formez avec Carole une équipe de secrétaires de choc pour les centres CIS et SPIN (plus particulièrement PMMC, ah non pardon Propice...) et que vous avez toujours le sourire en plus d'un rire très communicatif !!!

Merci au duo de co-bureau les plus adorables : Mélanie (encore...) et Timothée !!! Votre amour fait chaud au cœur lol !!! Mon pauvre Tim, tu es vraiment un héros d'avoir supporté Melle Pailleux pendant trois ans !!! Je t'admire !!! Je comprends maintenant pourquoi tu partais courir... En tout cas je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite aussi bien au niveau professionnel que personnel.

Merci aussi à tous les autres, plus particulièrement MCB, Laetitia V (au passage, félicitations !!!), Henri, Alex et Jérôme (au fait tu as toujours mon PC ???), Lydie, Raquel, Laurent, Anne-Marie mais aussi les anciens doctorants dont la soutenance ne faisait que me rappeler que nous étions les prochains sur la liste : JC, Marthe, Laetitia P...

Maintenant je souhaite bon courage aux plus ou moins nouveaux : Thomas, Akira, Antoine, Seb, Hélène, Estelle, Agathe et Andréa tout particulièrement puisque c'est toi qui prends ma suite !!!

Merci aussi à ma nouvelle co-bureau Coralie même si j'ai un peu peur car j'ai appris que tu chassais le chamois...

Quoi qu'il en soit malgré la soi-disant « rivalité » SPIN-CIS, cela ne nous empêche pas de faire des soirées ensemble et de bien nous amuser !!! Un grand merci à tous pour votre bonne humeur et vive le soccer 5 !!!

Enfin je ne pourrai pas terminer cette longue liste de remerciements sans parler de ma famille !!! Je souhaite en priorité remercier profondément mes parents qui m'ont toujours soutenus dans mes études (un peu longues quand même...). C'est grâce à vous si je suis arrivée avec succès si loin et je vous en remercie !!! On souhaite toujours que nos parents soient fiers de nous...

Merci aussi à mon frère adoré et au reste de ma famille qui est venue en force assister à ma soutenance. J'ai été très touchée !!!

Merci aussi à mes chers amis et plus particulièrement à Charlotte et Elo pour l'intérêt que vous m'avez toujours porté.

Enfin et surtout merci à mon chéri, Vivien, qui me rappelle sans cesse que j'ai beau avoir fait une thèse je ne sais toujours pas faire cuire un œuf... La vie est un long apprentissage et je suis comblée de progresser à tes côtés. Merci du fond du cœur pour ta patience et ton amour.

Voilà, 1^{er} challenge terminé !!!

Mais ce n'est pas la fin, ce n'est que le début...

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	7
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	9
<i>I. Nanoparticules et nanotechnologies</i>	<i>11</i>
I.1 Le nanomonde	11
I.2 Classification et procédés de synthèse des nano-objets	13
I.2.1 Classification des nano-objets	13
I.2.2 Synthèse des nanoparticules	15
I.3 Les domaines d'applications des nanoparticules	16
I.4 Définition du risque et réglementations	18
I.4.1 Evaluation du risque sanitaire	18
I.4.2 Réglementations	22
<i>II. Interactions particules/vivant</i>	<i>24</i>
II.1 Pénétration des particules dans l'organisme	24
II.1.1 Voie respiratoire	25
II.1.1.1 Données anatomiques	25
II.1.1.2 Devenir des particules inhalées	28
II.1.2 Autres voies de pénétration	31
II.1.2.1 Voie digestive	31
II.1.2.2 Voie cutanée	33
II.1.3 Translocation systémique des nanoparticules	34
II.2 Processus d'internalisation cellulaire des nanoparticules	37
II.2.1 La cellule et le modèle macrophage	37
II.2.2 Trafic intracellulaire	40
II.2.2.1 Les membranes biologiques	40
II.2.2.2 Transport vésiculaire et mécanismes d'endocytose	42
II.2.2.3 La phagocytose	43
II.2.2.3.1 Les différentes étapes du processus de phagocytose	43
II.2.2.3.1 Quantification du processus de phagocytose	49
II.2.3 Le cytosquelette : structure d'interaction avec le milieu environnant	50
II.2.3.1 Filaments intermédiaires et microtubules	51
II.2.3.2 Microfilaments d'actine	53
II.2.3.2.1 Généralités	53
II.2.3.2.2 Organisation des microfilaments d'actine et contacts focaux	54
II.2.3.2.3 Toxines influant sur les filaments du cytosquelette	57
<i>III. Impact des paramètres physico-chimiques sur l'activité biologique</i>	<i>59</i>
III.1 Influence des paramètres physico-chimiques	59
III.2 Nanotoxicologie	63
<i>IV. Approche expérimentale</i>	<i>71</i>
PARTIE EXPERIMENTALE	77
<i>I. Quantification de l'internalisation de particules micrométriques</i>	<i>79</i>
I.1 Introduction et méthodologie	79
I.2 Publication 1	83
I.3 Données complémentaires	93
I.3.1 Observations microscopiques	93
I.3.2 Les marquages cellulaires fluorescents	95
I.3.2.1 Marquage des membranes plasmiques	95
I.3.2.2 Marquage des lysosomes au Lysotracker®	97
I.3.3 Evaluation de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux	98
I.3.4 Étude dynamique du processus de phagocytose	99

I.3.4.1 Effet du ratio de microparticules par cellule	99
I.3.4.2 Effet du temps de contact entre les microparticules et les macrophages	100
I.4 Bilan sur l'internalisation de particules micrométriques	101
II. Particules nanométriques doublement fluorescentes pour évaluer l'internalisation	105
II.1 Introduction et développements techniques	105
II.1.1 Synthèse des nanoparticules fluorescentes	107
II.1.2 Données sur les mises au point des nanoparticules	108
II.2 Publication 2 - Soumise	111
II.3 Observations microscopiques complémentaires	136
II.4 Bilan sur l'internalisation des particules nanométriques doublement fluorescentes	139
III. Impact des paramètres physico-chimiques des nanoparticules sur leur internalisation	143
III.1 Impact du paramètre taille des nanoparticules	143
III.1.1 Publication 3 – A soumettre	147
III.1.2 Données complémentaires	173
III.1.2.1 Aspects morphologiques	173
III.1.2.2 Distribution en taille des nanoparticules	174
III.1.3 Bilan sur l'impact du paramètre taille des nanoparticules	174
III.2 Perspectives sur l'impact du paramètre charge de surface des nanoparticules	175
CONCLUSIONS PERSPECTIVES	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187
ANNEXES	209
I. Culture cellulaire de macrophages	211
II. Techniques de microscopie	212
II.1 Microscopie confocale	212
II.2 Microscopie électronique	217
II.2.1 Microscopie électronique à balayage	217
II.2.2 Microscope électronique à transmission	219
II.3 Cytométrie en flux	221
II.4 Physico-chimie des particules : taille et potentiel zêta	224
II.4.1 Diffusion dynamique de la lumière	224
II.4.2 Le potentiel zêta	225
II.5 Nanotoxicologie <i>in vitro</i>	227
II.5.1 Cytotoxicité	227
II.5.2 Réaction inflammatoire	228
II.5.3 Stress oxydant global	229
II.5.4 Stress oxydant spécifique aux H ₂ O ₂	230
BIBLIOMETRIE PERSONNELLE	231

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Echelle de taille du vivant (Adapté de svt.ac-dijon.fr et Goutayer, 2008).	11
Figure 2 : Schéma représentant la relation entre taille et surface spécifique (Klein, 2011).	12
Figure 3 : Feuille de lotus et patte de gecko avec le détail en microscopie électronique à balayage (fausses couleurs) de micropoils de 5 μm de diamètre qui se ramifient pour former des nanopils de 200 nm de diamètre (herpeto-terrario.forumpro.fr).	13
Figure 4 : Schéma représentant les différentes catégories de nanoparticules selon leur degré de dimension nanométrique (Ibatesa 2007).	14
Figure 5 : Approches d'élaboration des nano-objets et des nanomatériaux manufacturés (INRS).	16
Figure 6 : Approche classique de l'évaluation du risque (Ostiguy et al., 2010).	21
Figure 7 : Schéma récapitulatif des différentes voies d'exposition et de pénétration des nanoparticules dans l'organisme humain (Stern 2008).	24
Figure 8 : Schéma de l'appareil respiratoire humain (Adapté de scientific.forumactif.net).	25
Figure 9 : Schéma d'une bronchiole terminale ouverte sur un acinus et coupe transversale d'une alvéole pulmonaire (Adapté de wikipedia.org et academic.ru).	26
Figure 10 : Schéma de la paroi inter-alvéolaire. La barrière alvéolo-capillaire correspond à la zone fonctionnelle et représente environ 30% de la paroi (Précis d'histologie, Sobotta Welsch).	26
Figure 11 : Schéma du drainage lymphatique de l'espace pleural (Murphy et al. 2011).	27
Figure 12 : Illustration des différents mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires (Hervé-Bazin et Collectif 2007).	29
Figure 13 : Prédiction de dépôt dans les voies respiratoires de nanoparticules de 20 nm. La courbe noire correspond à la fraction totale de nanoparticules déposées dans les voies respiratoires. Les courbes verte, bleue et grise correspondent respectivement aux fractions de nanoparticules déposées au niveau extrathoracique, trachéobronchique et alvéolaire (Nanosafe).	29
Figure 14 : Pourcentage des particules déposées dans différentes régions de l'appareil respiratoire en fonction de la taille (Witschger et Fabries, 2005).	30
Figure 15 : Schéma de l'appareil digestif humain (futura-sciences.com).	31
Figure 16 : Schéma de la barrière intestinale présentant le rôle principal des entérocytes dans la fonction d'absorption des nutriments (svt.ac-dijon.fr).	32
Figure 17 : Schéma de l'appareil cutané humain (www.infovisual.info).	33
Figure 18 : Schéma du corps humain avec les voies d'exposition aux nanoparticules et les disséminations préférentielles (Buzea et al. 2006).	35
Figure 19 : Principales voies de biodistribution des nanoparticules (Traduit de Oberdörster et al. 2005).	36
Figure 20 : Structure d'une cellule eucaryote (Encyclopédie Encarta).	37
Figure 21 : Schéma simplifié du processus d'hématopoïèse (unites.uqam.ca).	38
Figure 22 : Images réalisées en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie photonique après coloration cytologique par la méthode de MGG (B) sur des macrophages de la lignée RAW 264.7.	38
Figure 23 : Schéma de la bicouche lipidique constituant les membranes biologiques (Adapté de futura-sciences.com).	40
Figure 24 : Fusion membranaire (a et b). Hémifusion (c) et pore de fusion (d) (Li Yang and Huey Huang model 2002).	41
Figure 25 : Schéma des voies d'exocytose et d'endocytose (Traduit de Tovenud).	42
Figure 26 : Les différentes voies d'endocytose (Traduit de Conner et al, 2003).	43
Figure 27 : Schéma illustrant les différentes étapes de la phagocytose (Adapté de Boumahdi, 2009).	44
Figure 28 : Mécanismes de phagocytose. (A) Phagocytose médiée par les récepteurs Fc γ . (B) Phagocytose médiée par le récepteur C3. (C) Phagocytose des corps apoptotiques (D'après Chimini et al, 2000).	45

Figure 29 : Déplacement orienté d'une cellule sur un support : phénomène de locomotion (Adapté de archimede.ca).	46
Figure 30 : Schéma récapitulatif des activités lytiques des lysosomes (Histologie, Jean Pierre DADOUNE, Médecine-Sciences Flammarion).	48
Figure 31 : Les trois principaux constituants du cytosquelette : filaments intermédiaires (FI), microtubules (MT) et microfilaments d'actine (Adapté de humans.be).	51
Figure 32 : Moteurs moléculaires et cytosquelette (facbio.com).	52
Figure 33 : Présentation d'un microfilament d'actine (humans.be).	54
Figure 34 : Organisation des microfilaments d'actine au niveau cellulaire.	55
Figure 35 : Schéma détaillant la structure des podosomes. Une organisation particulière des différents types de protéines (intégrines, vinculine, paxilline, taline, α -actinine et filaments d'actine) existe à la périphérie et au centre du podosome (Actin dynamics SPP 1464).	56
Figure 36 Pourcentage de neutrophiles recrutés dans les alvéoles pulmonaires après 24h d'inflammation déclenchée par instillation intratrachéale de particules de TiO_2 (Oberdörster et al., 2000).	65
Figure 37 : Les espèces réactives oxygénées et leur système de détoxification (version simplifiée). SOD : superoxyde dismutase, GSH-peroxydase : glutathion peroxydase. Si ce système est submergé, il y a une situation de stress oxydant (Wikipedia.org).	66
Figure 38 : Paramètres biologiques permettant l'évaluation de la toxicité des nanoparticules mis en place (Adapté de Boumahdi, 2009).	69
Figure 39 : Image réalisée en microscopie photonique après coloration cytologique par la méthode de May Grünwald Giemsa (MGG) sur des macrophages de la lignée RAW 264.7 mises en contact avec des billes de 2 μm de diamètre au ratio de 10 billes pour une cellule (10/1 ϵ) après 6 heures d'incubation (objectif x60).	72
Figure 40 : Diagramme représentant l'objectif des liens à établir au cours de cette étude.	72
Figure 41 : Schéma simplifié du fonctionnement du quenching au bleu trypan.	80
Figure 42 : Images réalisées en microscopie photonique après coloration cytologique par la méthode de MGG (A et B) (Objectif x60) et en microscopie électronique à balayage (C et D) sur des cellules de la lignée RAW 264.7 mises en contact avec des billes P (10/1 ϵ) après 6 heures d'incubation (A et B) ou après 16h d'incubation (C et D).	93
Figure 43 : Images obtenues lors de l'acquisition en vidéomicroscopie sur une durée de 16h de macrophages de la lignée RAW 264.7 mises en contact avec des billes P (10/1 ϵ).	94
Figure 44 : Marquage PKH26 (dilution 1/100) sur des macrophages de la lignée RAW 264.7. (A) cellules marquées au PKH26 + billes P après 24h, (B) cellules marquées au PKH26 sans billes, (C) cellules marquées au PKH26 + billes P (10/1 ϵ) après 24h, (D) cellules marquées au PKH26 + billes I (10/1 ϵ) après 24h. Les images (C et D) correspondent à la projection maximale de la fluorescence obtenue pour une pile d'images de la zone sélectionnée.	95
Figure 45 : Marquage du cortex d'actine sous-membranaire à la phalloïdine sur des macrophages de la lignée RAW 264.7 après 24h de contact avec des billes S (10/1 ϵ). (A) Projection max de la pile d'images réalisés sur ce plan pour les billes (vert), la phalloïdine (rouge) et la superposition des deux. (B et C) correspondent à des projections de plans de coupe selon les axes XZ et YZ permettant l'évaluation de la position d'une bille particulière (située à l'intersection des lignes blanches).	96
Figure 46 : Marquage au LysoTracker® Red DND-99 sur des macrophages de la lignée RAW 264.7. (A) marquage LysoTracker® seul (image de la fluorescence + image de contraste et superposition des deux), (B) cellules + billes P (10/1 ϵ) 24h + marquage LysoTracker®, (C) cellules + billes I (50/1 ϵ) 24h + marquage LysoTracker®. Les images (B et C) présentent les billes (fluorescence verte) et le marquage LysoTracker® (fluorescence rouge) ainsi qu'une superposition des deux images.	97
Figure 47 : Profil des cytogrammes obtenus lors de l'évaluation de la mortalité cellulaire grâce à l'utilisation d'iodure de propidium sur les macrophages de la lignée RAW 264.7 en CMF. Les cellules iodure de propidium positives se trouvent dans les quadrants supérieurs gauche et droit de chaque cytogramme. L'utilisation des deux canaux de fluorescence FL1 (Fluorescence vertes – billes) et FL3 (Fluorescence rouge – iodure de propidium) simultanément permet de faire la distinction entre les cellules mortes sans billes (en haut à gauche sur les cytogrammes) et les cellules mortes avec billes (en haut à droite sur les cytogrammes) exprimées en pourcentages.	98
Figure 48 : Graphiques relatifs à l'effet du ratio nombre de billes (P ou I) pour une cellule sur les macrophages de la lignée RAW 264.7. (A) MFI totale (sans BT), (B) pourcentage de cellules phagocytantes (avec BT), (C) Side scatter (Y	

Geo Mean). La durée de contact entre les billes et les cellules était fixée à 90 minutes. Trois ratios de billes P (10/1 ϕ , 20/1 ϕ et 30/1 ϕ) ainsi que cinq ratios de billes I (10/1 ϕ , 20/1 ϕ , 30/1 ϕ , 50/1 ϕ et 100/1 ϕ) ont été testés (n=4).....	99
Figure 49 : Graphiques relatifs à l'effet de la durée d'incubation des billes P et I avec les macrophages de la lignée RAW 264.7. (A) MFI totale (sans BT), (B) pourcentage de cellules phagocytantes (avec BT), (C) Side scatter (Y Geo Mean). Les billes P à 10/1 ϕ et les billes I à 50/1 ϕ ont été incubées 2h, 4h, 6h, 8h et 22h.	100
Figure 50 : Principe de fonctionnement de la sonde pHrodo. (A) Principe expliqué avec la molécule de pHrodo fonctionnalisée sur des bactéries. (B) Image illustrative. (C) Spectre d'émission de la sonde en fonction du pH.	105
Figure 51 : Structure schématique des nanoparticules développées.	107
Figure 52 : Exemples de cytogrammes obtenus lors de l'évaluation des coefficients de variation en CMF pour différents lots de nanoparticules testés. L'axe des ordonnées présente le nombre d'événements tandis que l'axe des abscisses reflète l'intensité de fluorescence sur le canal FL1 (fluorescence verte correspondant à la FITC contenue dans les nanoparticules). Ce type de cytogrammes permet d'obtenir la valeur du CV.	110
Figure 53 : Profil de distribution en taille obtenu avec la technique de DLS. Exemple présenté pour le lot de nanoparticules 178.09.....	110
Figure 54 : Images réalisées en microscopie photonique après coloration cytologique par la méthode de MGG sur des macrophages de la lignée RAW 264.7 mises en contact 2h ou 24h avec des NP500 5% FITC et NP770 2% FITC (Objectif x60).	136
Figure 55 : Exemples de NP250 et NP800 2% FITC + 0,3 ou 0,5% de pHrodo en microscopie à épifluorescence après contact de 2h avec des macrophages RAW 264.7 (Objectif x40).	137
Figure 56 : (A) Spectre de fluorescence de NP500 5% FITC (lot 181.09). (B) Observation en microscopie confocale de macrophages RAW 264.7 après contact de 24h avec des NP500 5% FITC (lot 181.09).	138
Figure 57 : (A) Spectre de fluorescence de NP260 2% FITC (lot 212.09). (B) Observation en microscopie confocale de macrophages RAW 264.7 après contact de 24h avec des NP260 2% FITC (lot 212.09).	138
Figure 58 : Observation en microscopie confocale de macrophages RAW 264.7 après contact de 24h avec des NP500 1,23% FITC + 0,5% pHrodo.	139
Figure 59 : Exemple de courbe étalon obtenue après analyse de la fluorescence en fluorimétrie (n=4).	144
Figure 60 : Schéma d'une torche à plasma dans un appareillage de spectroscopie d'absorption atomique (didel.script.univ-paris-diderot.fr).	145
Figure 61 : Images représentatives des données morphologiques observables pour les quatre tailles de nanoparticules incubées 24h avec les macrophages puis cytocentrifugées sur lame et colorées au MGG (objectif x60).	173
Figure 62 : Profil obtenu après analyse en DLS des 4 tailles de nanoparticules (n=3).	174
Figure 63 : Observation en microscopie confocale de macrophages RAW 264.7 après contact de 24h avec des nanoparticules FITC de charge négative.	176
Figure 64 : Observation en microscopie confocale de lymphocytes LH T2 après contact de 24h avec des nanoparticules RBITC Si 12 ou Si 13 (rouge). Le marqueur membranaire de surface CD45 est vert.	177
Figure 65 : Schéma bilan des paramètres physico-chimiques contrôlés des nanoparticules, des outils d'étude de l'internalisation cellulaire et des tests de toxicité mis en place dans ces travaux de thèse.	184
Figure 66 : Diagramme représentant l'objectif des liens à établir pour poursuivre sur cette thématique.	185
Figure 67 : Observations de la lignée de macrophages RAW 264.7 après coloration MGG (objectif x40) et après préparation et observation en MEB.	211
Figure 68 : Principe de la confocalité d'un microscope à balayage laser. Seule la lumière d'émission de fluorescence (beam splitter) provenant du plan focal (focus level) est collectée au niveau du détecteur (photomultiplicateur) pour constituer l'image (CMCM Stéphaneois).	213
Figure 69 : Balayage point par point de l'échantillon dans les directions XY grâce à des miroirs galvanométriques et d'un déplacement selon l'axe optique Z (CMCM Stéphaneois).	214
Figure 70 : Schéma explicatif des sections de plans de coupe en microscopie confocale avec l'image d'un plan focal en XZ et YZ, et d'une image moyennée finale acquise sur une série de plans de coupe.	214
Figure 71 : Différence de netteté entre une image confocale et non-confocale (CMCM Stéphaneois).	215
Figure 72 : Schéma explicatif de la fluorescence (CMCM Stéphaneois).	216
Figure 73 : Déplacement de Stokes (CMCM Stéphaneois).	216
Figure 74 : Schéma du principe d'un Microscope Electronique à Balayage (Irmh).	218

Figure 75 : Schéma des interactions faisceau d'électrons-matière (Klein, 2011).	220
Figure 76 : Principe de la cytométrie en flux. Focalisation hydrodynamique des objets grâce au système fluïdique.	
Schéma du trajet optique emprunté par les différents lasers (CCCF Stéphanois).	221
Figure 77 : Schéma explicatif des paramètres détectables en CMF (CCCF Stéphanois).	222
Figure 78 : Chemin optique du cytomètre du CCCF de Saint-Etienne (CCCF Stéphanois).	223
Figure 79 : Principe de la technique de diffusion dynamique de la lumière (ujkeb.com).	224
Figure 80 : En DLS, la courbe d'auto corrélation créée à partir des variations d'intensité du signal permet d'obtenir des informations sur le mouvement des particules et ainsi d'en déduire leur taille (Klein, 2011).	224
Figure 81 : Charge et potentiels électriques d'une particule dont le potentiel zêta (Simon-Deckers, 2008).	225
Figure 82 : Principe du dosage de la LDH (Promega).	227
Figure 83 : Principe du dosage ELISA du TNF- α .	228
Figure 84 : Principe de l'essai « Oxiselect » (Euromedex).	229

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales sources de nanoparticules (G. Oberdörster et al. 2005).	14
Tableau 2 : Applications visées par l'utilisation de nanomatériaux, entreprises concernées et estimation de la production mondiale actuelle (Afsset 2006).	18
Tableau 3 : Classification des macrophages (Histologie, Jean Pierre DADOUNE, Médecine-Sciences Flammarion).	39
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des principales toxines ciblant le cytosquelette.	57
Tableau 5 : Principaux paramètres physico-chimiques des nanoparticules pouvant avoir une influence sur l'activité biologique (Adapté de Zeyons, 2008).	59
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des principales particules et nanoparticules étudiées ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques.	74
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différents types de nanoparticules testées au cours de la collaboration avec Nano-H. Les caractéristiques des nanoparticules sont résumées : lot, date, taille, pourcentage de fluorochromes, fonctionnalisation de surface et nombre de particules théorique par mL. Les données de microscopie correspondent à une évaluation visuelle. Enfin, pour la CMF les données reflètent la capacité de détection de la fluorescence et la valeur du coefficient de variation (CV) reflétant l'homogénéité de répartition de la fluorescence verte (FITC) au sein de l'échantillon analysé.	109
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des nanoparticules-FITC de tailles différentes.	143
Tableau 9 : Principaux composés fluorescents utilisés avec leur longueur d'onde d'excitation et d'émission.	217
Tableau 10 : Comparatif des avantages et inconvénients de la CMF par rapport aux techniques de microscopie.	223

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

BT : bleu trypan (TB pour trypan blue)

CMF : cytométrie en flux (FCM pour flow cytometry)

Cyt-D : cytochalasine-D

DLS : dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)

FITC : fluorescéine isothiocyanate

FSC : forward scatter

ICP : induced coupled plasma spectroscopy (spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma)

IP : iodure de propidium (PI pour propidium iodide)

Jasp : jasplakinolide

Lat : latrunculine

LBA : lavages broncho-alvéolaires

LDH : lactate déshydrogénase

MEB : microscopie électronique à balayage (SEM pour scanning electron microscopy)

MET : microscopie électronique à transmission (TEM pour transmission electron microscopy)

MFI : mean fluorescence intensity (intensité moyenne de fluorescence)

MGG : May-Grünwald Giemsa

MTT : sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)

PFA : paraformaldéhyde

ROS : reactive oxygen species (espèces oxygénées réactives)

SSC : side scatter

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Nanoparticules et nanotechnologies

I.1 Le nanomonde

Une échelle de taille du vivant permet de montrer que le domaine du visible pour l'homme s'arrête en dessous du millimètre (**Figure 1**). Or c'est en dessous de ce niveau que les réactions physiques et biologiques prennent tout leur sens. La microscopie permet dès les années 1600 d'expliquer le comportement de la matière par sa structure à l'échelle microscopique. C'est ensuite vers 1931, soit près de trois siècles après, qu'est inventé le microscope électronique qui permet aujourd'hui grâce à son pouvoir de résolution en transmission d'observer des objets de taille d'environ 0,1 nm. Il est de plus très intéressant de constater sur cette échelle que l'ordre de grandeur des nanoparticules correspond à la taille moyenne des protéines mais aussi à la taille d'un virus.

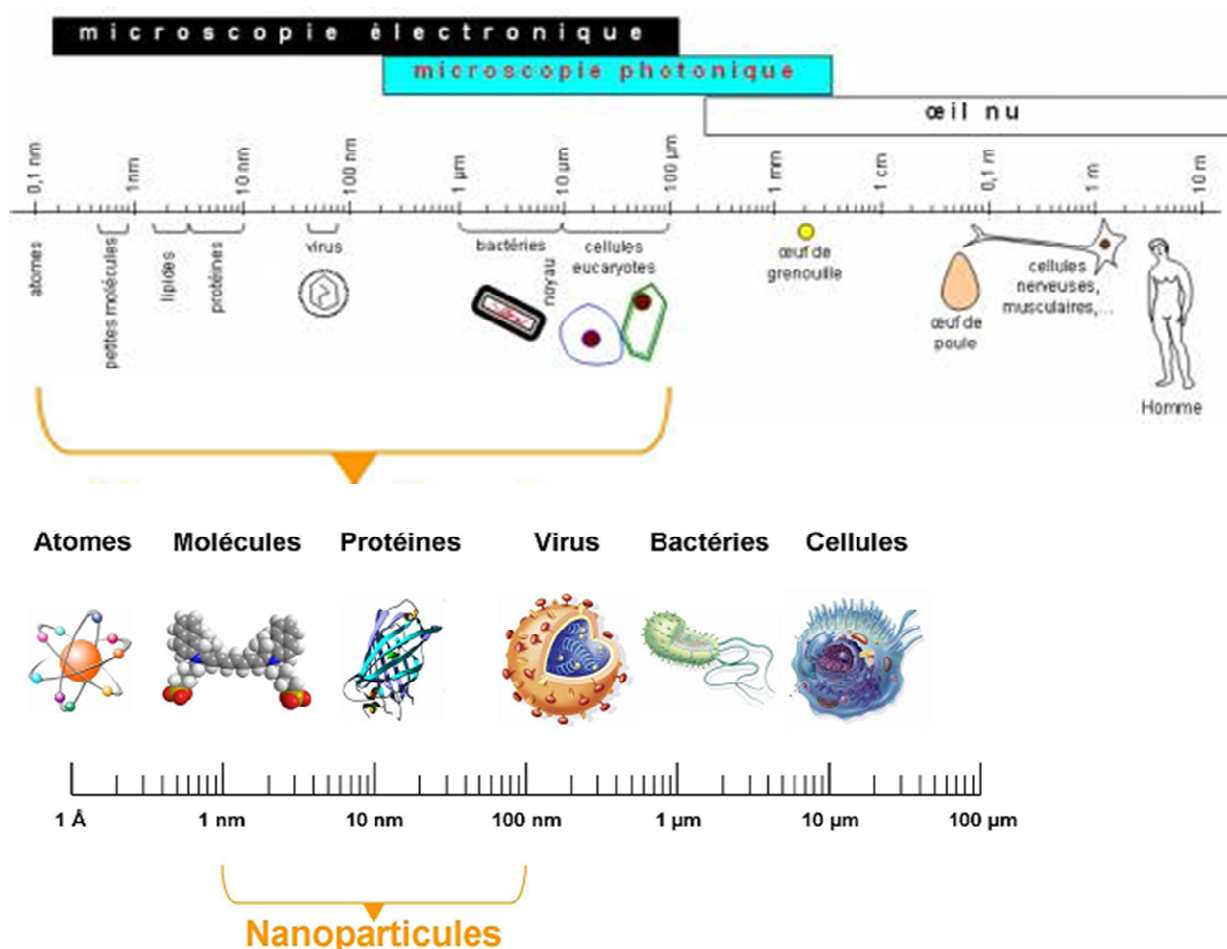


Figure 1 : Echelle de taille du vivant (Adapté de svt.ac-dijon.fr et Goutayer, 2008).

A l'échelle de mesure nanométrique (10^{-9} m), les matériaux et les systèmes révèlent des caractéristiques particulières régissant les propriétés ainsi que les phénomènes et processus physiques, chimiques ou biologiques en cause. Tout changement d'échelle s'accompagne d'une modification profonde des relations que les objets entretiennent entre eux. Ainsi les lois physiques

qui régissent le « nanomonde » offrent de nouvelles possibilités. En effet, une réduction par exemple d'un facteur deux de la taille d'un objet, implique une réduction d'un facteur quatre de sa surface et huit de son volume. A l'échelle nanométrique, les propriétés de la matière sont donc modifiées, conduisant à de grandes différences en termes de tension de surface pour les liquides ou solutés et de propriétés thermodynamiques, ce qui conduit à des comportements originaux en catalyse chimique entre autres. Les propriétés de la nanomatière ne peuvent être déduites de celles de la même matière à plus grande échelle.

A titre d'exemple, la taille nanométrique d'un objet va lui conférer des propriétés remarquables comme une surface spécifique très importante (**Figure 2**). Considérons une microparticule cubique d'un micromètre de côté et ayant une surface spécifique de $6 \mu\text{m}^2$, si on estime que cette microparticule est composée de nanoparticules de 1 nm de côté alors elle aura un volume de 10^9 nm^3 et une surface spécifique cumulée de toutes les nanoparticules de $6.10^3 \mu\text{m}^2$. Donc à volume égal, la surface spécifique des nanoparticules est mille fois plus grande que celle d'une microparticule.

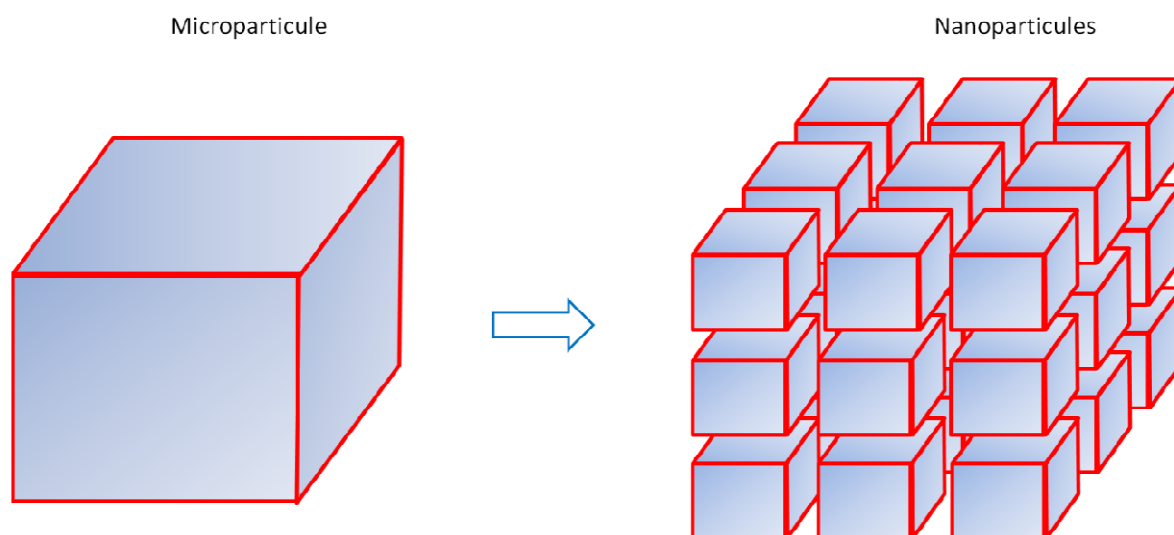


Figure 2 : Schéma représentant la relation entre taille et surface spécifique (Klein, 2011).

C'est avec cette propriété de surface spécifique très importante que les nano-objets vont posséder de nombreuses propriétés originales et spécifiques pouvant conduire à de larges domaines d'applications.

Mais avant de parler de « nanotechnologies », il est important de noter qu'il existe déjà de façon naturelle depuis des milliards d'années des particules et autres structures de taille nanométrique. Animaux et végétaux ont ainsi développé, au fil de leur évolution, des arrangements nanométriques de leur matière qui leur confère des propriétés parfois indispensables à leur survie. Parmi les exemples les plus connus, la feuille de lotus possède des reliefs de taille nanométrique lui procurant des propriétés hydrophobes et auto-nettoyantes, ou le gecko, un petit lézard capable de se déplacer sur les surfaces les plus lisses grâce à ses pattes pourvues de poils de 200 nm de diamètre entre lesquels vont s'établir des forces de Van der Waals (**Figure 3**).



Figure 3 : Feuille de lotus et patte de gecko avec le détail en microscopie électronique à balayage (fausses couleurs) de micropoils de 5 μm de diamètre qui se ramifient pour former des nanopoils de 200 nm de diamètre (herpeto-terrario.forumpro.fr).

La nature est donc une puissante source d'inspiration et de découverte pour les chercheurs voulant comprendre et tenter de reproduire ces propriétés exceptionnelles. Ceci correspond à la notion de biomimétisme. La recherche s'intéresse de près à ces mécanismes pour développer des « nanotechnologies ». Ce terme fut utilisé pour la première fois en 1974 par Norio Taniguchi, puis popularisé par K. Éric Drexler dans les années 1980, lorsque celui-ci introduisit le terme de « manufacture moléculaire ». Richard Feynman fut le premier scientifique à avancer l'idée qu'il serait bientôt possible pour l'homme de transformer la matière au niveau atomique.

L'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) définit en 2008 les nanotechnologies comme suit : « *L'application de la connaissance scientifique pour manipuler et contrôler la matière à l'échelle nanométrique, afin d'utiliser les propriétés et les phénomènes dépendant de la taille et de la structure, distincts de ceux associés aux atomes individuels ou aux molécules, ou aux matériaux massifs.* ». Il s'agit donc d'exploiter les propriétés spécifiques qu'a la matière lorsqu'elle est structurée à l'échelle nanométrique. Cela recouvre des domaines extrêmement vastes avec des possibilités d'application pratiquement infinies.

I.2 Classification et procédés de synthèse des nano-objets

I.2.1 Classification des nano-objets

Ces nano-objets peuvent être classés selon leurs origines :

- Origine naturelle : provenant principalement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz à vapeurs dans l'atmosphère ainsi que des cendres volcaniques.
- Origine anthropogénique non-intentionnelle, également appelée accidentelle, issue des procédés chauds tels que le soudage ou encore la combustion des moteurs.
- Origine anthropogénique intentionnelle ou industrielle ou encore nanomatériaux manufacturés par l'homme.

Dans le **Tableau 1** sont regroupées différentes sources de nanoparticules.

Naturelles	Anthropogéniques	
	Non intentionnelles	Intentionnelles
Conversions gaz/particules	Combustion des moteurs	Nanomatériaux
Feux de forêts	Centrales électriques	manufacturés: nanoparticules,
Lave de volcans	Incinérateurs	nanotubes, nanofilms
Virus	Avions	Métaux semi-conducteurs :
Magnétites biogéniques :	Fumées de métaux (soudage, etc.)	oxydes métalliques, carbone
bactéries, protozoaires,	Fumées de polymères	
mollusques, arthropodes,	Autres fumées	
poissons, oiseaux, cerveau	Surfaces chauffées	
humain	Fritures, grillades	
Ferritine	Moteurs électriques	

Tableau 1 : Principales sources de nanoparticules (G. Oberdörster et al. 2005).

Le terme « nanoparticules » est utilisé pour des particules dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm. Le rayon typique d'un atome étant de 0,1 nm, une nanoparticule peut être composée de quelques dizaines à plusieurs centaines d'atomes. Les nanoparticules sont classées en fonction du nombre de leur dimension de taille nanométrique (**Figure 4**) :

- **Dimensions 3** (aucune dimension nanométrique) : matériaux tels que les nanocomposites (composites renforcés avec des nano-objets comme par exemple des nanotubes), ou les solides nanocristallins : solides macroscopiques constitués de nanocristaux.
- **Dimension 2** (une dimension nanométrique) : matériaux avec une dimension à l'échelle nanométrique typique des films et des revêtements de surface. Les revêtements ont été utilisés pendant des décennies dans divers champs comme l'électronique ou la chimie.
- **Dimension 1** (deux dimensions nanométriques) : matériaux avec deux dimensions à l'échelle nanométrique par exemple les nanofibres, les nanotubes, les nanofilaments et nanobâtonnets (nanotube de carbone, nanofibre de SiC, nanotube de bore, etc.). Ils ont donc une de leurs trois dimensions supérieure à 100 nm : un diamètre de 1 à quelques nanomètres et une longueur de 500 nm à 10 μ m.
- **Dimension 0** (trois dimensions nanométriques) : nanoparticules ou particules ultrafines (particules manufacturées ou issues de procédés industriels).

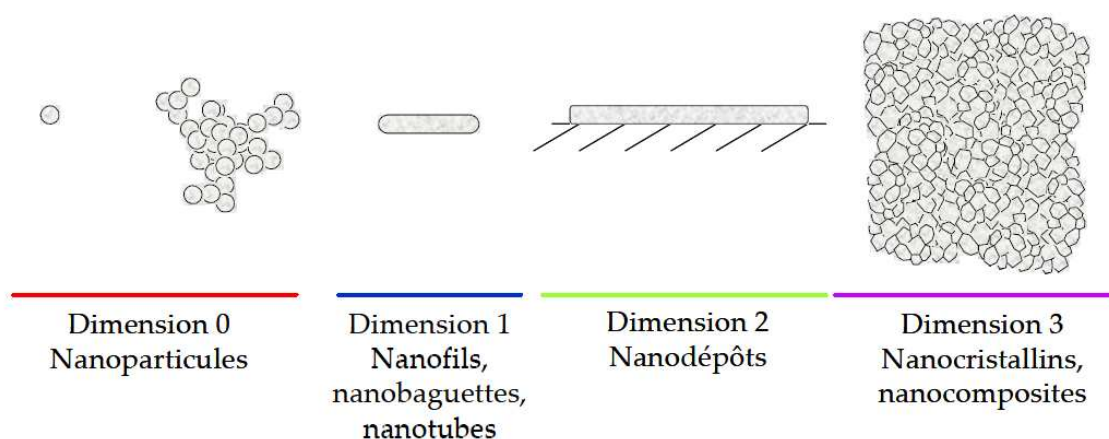


Figure 4 : Schéma représentant les différentes catégories de nanoparticules selon leur degré de dimension nanométrique (Ibatesa 2007).

Les nanoparticules peuvent donc avoir des formes très diverses (sphériques, fibreuses, tubulaires, circulaires et planes) et nous verrons ultérieurement que les caractéristiques de la forme constituent un paramètre important lors des mesures de l'activité biologique.

Il existe déjà plus de 1300 types de nanoparticules manufacturées répertoriés dans au moins 475 produits en Europe et dans plus d'un millier sur le marché Américain. Ces nano-objets doivent, pour présenter un intérêt, faire preuve d'une propriété intéressante, pouvoir être produits aisément à l'échelle industrielle et savoir s'intégrer dans des produits existants. Parmi les plus connus, citons les nanoparticules de silice et de noir de carbone dans les pneumatiques, l'oxyde de titane dans des crèmes solaires et les nanotubes de carbone dans les raquettes de tennis. Ce nombre est de plus certainement sous-évalué car l'étiquetage des nano-éléments n'est pas obligatoire. En France, les lois Grenelle 1 et 2 votées en 2009 et 2010 prévoient d'obliger les industriels à déclarer les substances nanométriques qu'ils fabriquent, importent ou mettent sur le marché à l'autorité administrative et à en informer le public et les consommateurs.

Enfin un nanomatériau est défini comme un matériau composé de nano-objets, dont une des dimensions au moins est comprise entre 1 et 100 nm, et qui présente des propriétés spécifiques à l'échelle nanométrique. Ce confinement de la matière fait apparaître de nombreuses propriétés physiques (optique, catalytique, mécanique, magnétique, thermique, de conductivité, etc.) que ne possèdent pas les objets de plus grande taille. Les nanomatériaux introduisent une nouvelle façon de concevoir les matériaux (de fonction ou de structure), de les fabriquer et de les intégrer dans des produits. Cette nouvelle approche repose sur le contrôle de la structure des matériaux à l'échelle nanométrique. Toutes les classes de matériaux sont potentiellement concernées et tous les secteurs manufacturiers devraient bénéficier d'innovations et d'avancées technologiques apportées par les nanomatériaux.

Etant donné la complexité du « Nanomonde », la suite du travail est focalisée sur les nanoparticules.

I.2.2 Synthèse des nanoparticules

Les nanoparticules peuvent être synthétisées selon différentes approches mais essentiellement par les méthodes ascendantes et descendantes (**Figure 5**). Par l'approche ascendante, les nanoparticules sont construites atome par atome ou molécule par molécule. Dans l'approche descendante, une grande structure est graduellement sous-dimensionnée, jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques après application de sollicitations mécaniques sévères, de chocs violents et de fortes déformations. Les deux approches, tendent à converger en termes de dimension des particules synthétisées. L'approche ascendante paraît plus riche en ce sens qu'elle permet la production d'une plus grande diversité d'architectures et, souvent, un meilleur contrôle de l'état nanométrique (tailles et distribution granulométrique relativement monodisperse, positionnement des molécules, homogénéité des produits). De son côté, bien que capable de productions plus volumineuses, l'approche descendante rend en général le contrôle de l'état nanométrique plus délicat.

L'Institut Britannique de Normalisation (BSI, 2005) inventorie pas moins de 29 approches couramment utilisées pour la synthèse de nanoparticules. C'est au cours de ces procédés de fabrication en grandes quantités que les travailleurs sont susceptibles d'être exposés aux nanoparticules. Ces approches sont classées en trois grands types de procédés :

- Procédés chimiques (techniques sol-gel par exemple).
- Procédés physiques (pyrolyse au laser ou synthèse au plasma par exemple).
- Procédés mécaniques (mécano-synthèse par exemple).

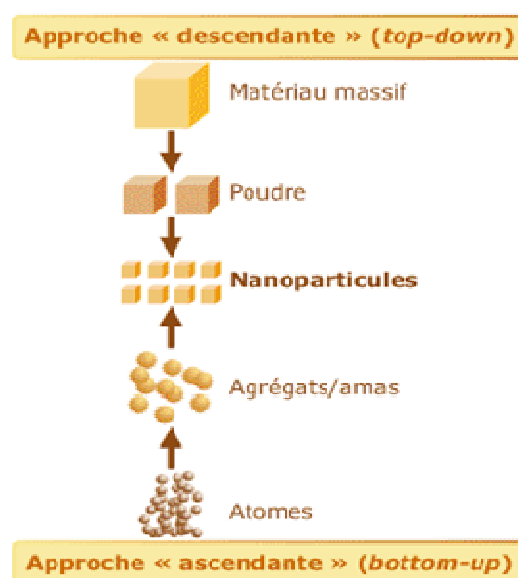


Figure 5 : Approches d'élaboration des nano-objets et des nanomatériaux manufacturés (INRS).

I.3 Les domaines d'applications des nanoparticules

Plusieurs secteurs clés émergent concernant l'utilisation des nanoparticules (AFSSAPS, 2011, AFSSET, 2006, AFSSET, 2008).

Le premier est l'électronique, pour lequel un exemple simple concerne le transistor (composant de base de tout microprocesseur) qui mesurait 12 micromètres dans les années 70 alors que le standard actuel est d'environ 32 nanomètres. Dans ce domaine les nanomatériaux les plus couramment utilisés sont le silicium et le graphène. De plus, en diminuant la taille d'un matériau isolant, il est possible de le rendre conducteur électriquement (effet tunnel). Des isolants peuvent également devenir conducteurs par incorporation en faible pourcentage de nanoparticules conductrices. En empilant des couches alternées de matériaux de natures différentes, et d'épaisseur nanométrique, il est possible d'obtenir des effets particuliers de magnétorésistance, de ferromagnétisme et de conductivité électronique.

Vient ensuite le domaine des matériaux de structure où un des exemples les plus marquant concerne l'ajout d'une nanopoudre de dioxyde de titane (TiO_2) dans le béton rendant celui-ci autonettoyant. Il permet de jouer le rôle de photocatalyseur rendant possible des réactions d'oxydoréduction. De plus, la structuration du matériau à l'échelle nanométrique permet d'obtenir

des tailles de grains de l'ordre des tailles caractéristiques des défauts qui gouvernent certaines propriétés. L'ensemble des propriétés mécaniques et tribologiques est donc amélioré. Par exemple, les céramiques nano-structurées sont plus résistantes et plus ductiles que les céramiques traditionnelles. De nombreux travaux sont également menés sur le renforcement des polymères avec des nanotubes ou des nanocharges argileuses. Il est possible dans ce cas d'obtenir des propriétés mécaniques améliorées. Des nanocharges de silice sont introduites dans les peintures pour augmenter la résistance à la rayure. Ces peintures sont notamment utilisées dans l'industrie automobile. Les charges nanométriques peuvent également être introduites dans des revêtements ou des huiles et des graisses pour des applications de lubrification et de limitation de l'usure.

Concernant le domaine environnemental, l'arrivée des nanoparticules a permis l'amélioration des batteries lithium-ion, avec notamment des nanoparticules de phosphate de fer lithié pour l'autonomie des véhicules électriques. De plus, dans les panneaux photovoltaïques, des nanocristaux de TiO_2 pourraient remplacer le silicium et augmenter leur rendement.

La défense est un secteur moins médiatisé mais utilise les nanotubes de carbone pour obtenir des matériaux et dépôts de surface plus résistants. Dans le domaine militaire de nombreuses recherches visent aussi à améliorer le camouflage, la détection d'agents chimiques et biologiques et la production de systèmes de surveillance miniaturisés entre autres.

Enfin la médecine représente un domaine très vaste où nanocapsules et nanovecteurs offrent la possibilité de cibler spécifiquement des cellules ou tissus (**Hillaireau and Couvreur, 2009, Horcajada et al., 2010**). Pour le moment, l'utilisation des nanotechnologies dans ce domaine reste marginale et concerne presque exclusivement la cancérologie. L'idée étant de permettre la libération ciblée du principe actif dans une zone donnée (tumeur par exemple) en évitant les zones saines car souvent les molécules actives sont toxiques pour les tissus sains (ex : paclitaxel utilisé en chimiothérapie). Ceci permettrait aussi de limiter les effets secondaires liés aux cures de chimiothérapies avec un effet néfaste restreint par rapport aux cellules saines voisines. La capacité qu'ont les nanocapsules à transporter efficacement les substances actives est aussi applicable en terme de thérapie génique (les nanocapsules remplaceraient ainsi les virus qui sont utilisés en thérapie génique) ou dans le domaine des adjuvants vaccinaux. Une autre application médicale des nanoparticules est l'identification de cibles (tumeurs) en imagerie pour mieux les éliminer de façon chirurgicale par le biais de l'amélioration des techniques d'imagerie notamment endoscopiques. Etablir des diagnostics plus précoces et donc améliorer la prise en charge des patients reste un enjeu de taille. Enfin le dernier exemple concerne la médecine régénérative (injection de précurseurs de cellules souches par exemple) et l'implantation des cellules souches avec des biomatériaux nano-structurés mimant l'environnement idéal nécessaire pour la prolifération de ces cellules.

D'autres exemples pertinents de secteurs d'activités et d'applications visées sont résumés dans le **Tableau 2**.

Secteurs	Applications visées	Fabricants-Utilisateurs	Production (2010)
Agro-alimentaire	Revêtement imperméable	Laiteries, vins	
	Membranes pour le traitement de liquides alimentaires		
	Marquage pour traçabilité		
Automobile	Revêtement auto lubrifiant, anti-rayure et anticorrosion	Rhodia, Michelin Saint-Gobain, Hutchinson Renault, Arcelor	Oxydes de Ce, Ti Nanotube de C
	Pneu vert, Pot catalytique		
	Vitrage autonettoyant, hydrophobe, athermique		
Chimie	Catalyseur pour chimie sélective	Rhodia, Arkéma	
	Photocatalyse pour production de H ₂		
Cosmétiques	Anti-UV, anti-vieillessement	L'Oréal, BASF DGTec	Oxydes de Ti, Zn, Fe 10 ³ t/an
	Antibactérien		
Électronique	Matériau isolant	Alliance, Croles Baikowski Arkéma, iNanov	Nanotube de C, oxydes de Ti, Zn, Fe, Ce 10 ² t/an
	Polissage de wafers et disques durs		
	Polymère nanostructuré pour électronique souple		
	Pile à combustible, Éclairage à basse consommation		
Énergie	Allègement de structure pour éolien	Toshiba, Arkéma, DGTec, Kodak, Phillips	
	Cristaux photoniques pour panneaux solaires		
Environnement	Traitement de pollutions	Orelis TAMI, Suez	Fe ⁰ , oxydes d'Al, Fe 10 ² t/an
	Traitement de l'eau potable		
Santé, pharmacie	Délivrance ciblée de médicaments	Arkéma Biometrix, DGTec	nC60, quantum dots, oxyde de Fe 1 t/an
	Réparation et implants		
Textile, habillement	Antibactérien, retard au feu, filtres UV et IR	DGTec, Rhodia Nano-Tex	
	Tissu indéfroissable et antisalissure		

Tableau 2 : Applications visées par l'utilisation de nanomatériaux, entreprises concernées et estimation de la production mondiale actuelle (Afsset 2006).

Depuis une quinzaine d'années, les nanomatériaux et leurs applications sont le moteur d'un grand nombre de travaux de recherche et développement dans le monde. Ces dernières années, les enjeux industriels liés à ces nouvelles technologies connaissent un essor considérable. Pour l'industrialisation, le nano-objet doit pouvoir être utilisé dans différents secteurs, sa production doit être techniquement maîtrisée et son intégration doit être possible dans des gammes de produits existants. Cet engouement général pour les nanomatériaux s'explique par les perspectives de retombées économiques impressionnantes. La Commission Européenne a estimé que le marché mondial des nanotechnologies en 2001 était légèrement supérieur à 40 milliards d'Euros. En 2010-2015, selon une estimation de la National Science Foundation (NSF, USA), les enjeux économiques liés à l'avènement des nanotechnologies au niveau mondial devraient atteindre 1000 milliards de dollars par an tous secteurs confondus.

I.4 Définition du risque et réglementations

I.4.1 Évaluation du risque sanitaire

De tous temps, les hommes ont été exposés à des particules ultrafines de taille nanométrique et micrométrique provenant de sources naturelles (poussières de sable, pollens, incendies, éruptions volcaniques, etc.) ou liées à des activités humaines (feux de bois, gaz d'échappement de véhicules,

chauffage urbain etc.). On distingue parmi ce dernier type de particules, les nanoparticules générées indirectement à l'occasion d'un processus particulier (comme les particules diesel) et les nanomatériaux manufacturés fabriqués intentionnellement pour être utilisés dans le cadre d'un processus industriel et qui font l'objet de nombreuses recherches.

Quoi qu'il en soit, il est très difficile d'évaluer les quantitativement et qualitativement les nanoparticules auxquelles nous sommes exposés chaque jour. En effet, il existe plusieurs voies d'exposition possibles (respiratoire, digestive, cutanée) qui seront développées dans la suite de ce mémoire. En général, les campagnes de mesures prennent en compte des particules diverses dénommées PM₁₀, PM_{2,5} et PM₁ selon leur taille en micromètres (PM - Particulate Matter) auxquelles se sont récemment ajoutées les particules ultrafines (PM_{0,1}) (**Donaldson et al., 2003, Geng et al., 2006**). Dans un milieu préservé comme la campagne par exemple, chaque mL d'air contient environ 10 000 nanoparticules. Ce chiffre augmente dans des zones urbaines plus exposées pouvant atteindre quelques centaines de milliers de nanoparticules. Il existe donc un énorme bruit de fond naturel mais il en est autrement en milieu professionnel (usine de silice, minoterie, atelier de soudage, etc.) où se concentrent plusieurs centaines de milliers de nanoparticules par mL d'air. Il est aussi important de noter que ces mesures concernent uniquement les nanoparticules présentes dans l'air mais de nombreuses nanoparticules sont présentes également dans l'eau.

Les nanomatériaux dont l'utilisation est amenée à s'étendre de façon importante dans les prochaines années, constituent de nouvelles sources potentielles d'exposition et il est légitime de poser dès aujourd'hui la question de leur éventuelle toxicité pour l'homme et pour les écosystèmes. Il est donc nécessaire d'évaluer le risque potentiel des nanoparticules pour l'homme et l'environnement. Bien que les perspectives ouvertes par les nanotechnologies semblent prometteuses, notamment dans le domaine de la santé, les connaissances sur la toxicité des nanoparticules manufacturées sont lacunaires et parfois contradictoires (**Warheit, 2010**). En outre, de nombreuses questions restent à résoudre avant de pouvoir évaluer les risques et les bénéfices liés à ces composés notamment sur le long terme. Ceci est principalement lié au fait qu'il n'existe pas de consensus permettant d'étudier le devenir de nanoparticules manufacturées dans des matrices complexes (environnement, aliments, organisme, etc.). De plus, du fait de leur très importante surface spécifique, les nanoparticules sont beaucoup plus réactives et donc davantage susceptibles d'interagir avec l'organisme que leurs homologues micrométriques. Il conviendra de distinguer les particules insolubles de leurs homologues solubles et/ou biodégradables se rapprochant donc plus de substances ordinaires.

On connaît depuis longtemps des maladies pulmonaires plus ou moins graves provoquées par l'inhalation de poussières de taille micrométrique, notamment en milieu professionnel : pneumoconioses, cancers broncho-pulmonaires ou de la plèvre (**Ostiguy, 1979**). Le terme pneumoconiose désigne un ensemble de maladies pulmonaires consécutives à l'inhalation de poussières. L'usage ne considère dans ce cadre que les affections secondaires à l'inhalation de particules inorganiques d'origine industrielle ou environnementale.

L'asbestose et la silicose sont les deux exemples les plus connus (**Hayashi and Kajita, 1988, Hamilton et al., 2008, Gambelli et al., 2004, Funahashi et al., 1984**).

- L'asbestose est due à l'inhalation de fibres d'amiante, minéral composé d'oxydes métalliques (MgO, SiO₂, FeO, CaO, Na₂O). Elle s'accompagne d'une fibrose interstitielle diffuse (atteinte du tissu conjonctif interstitiel) avec une éventuelle atteinte bronchiolaire pouvant évoluer vers un cancer pulmonaire ou pleural.

- La silicose est liée à l'inhalation de dioxyde de silicium (SiO_2) sous forme cristallisée. La forme habituelle est une maladie chronique encore évolutive après l'interruption de l'exposition. Anatomiquement, elle se caractérise par une fibrose circonscrite plus ou moins confluyente ou une fibrose massive progressive et/ou une fibrose interstitielle.

La fibrose pulmonaire est une maladie chronique secondaire à l'inflammation. Elle se caractérise par la formation de cicatrices fibreuses au niveau des poumons. Essentiellement bénigne, la maladie peut rester stable ou bien évoluer rapidement entraînant un dysfonctionnement de la barrière alvéolo-capillaire et s'accompagnant de problèmes de détresse respiratoire importants pouvant entraîner la mort. Certaines poussières ont en effet une toxicité bien démontrée : poussières de fer, de béryllium, de charbon, de silice, d'amiante ou autres poussières minérales, poussières organiques, etc. Depuis une dizaine d'années, des données issues de l'épidémiologie environnementale et de la toxicologie expérimentale permettent de penser que les particules ultrafines pourraient en raison même de leur dimension nanométrique, avoir une toxicité spécifique, et qu'il pourrait en être de même pour les nanoparticules manufacturées (**Sayes et al., 2007, Catelas et al., 1999, Donaldson et al., 2002, Andujar et al., 2009**).

Par ailleurs, le cancer est devenu en 2007 la principale cause de mortalité en France devant les maladies cardio-vasculaires. D'après les données du rapport 2003 de la Commission d'orientation sur le cancer, l'origine professionnelle des cancers est fortement suspectée dans 4 à 8,5% des cas. Il apparaît donc nécessaire d'étudier la cancérogénicité des agents présents dans les environnements professionnels afin d'évaluer les risques d'une exposition aux différents types de matériaux pulvérulents. Compte-tenu du fort développement des applications industrielles, ces nanomatériaux pourraient se révéler dangereux pour la santé, en premier lieu pour les travailleurs exposés dans ces domaines de production et à un moindre degré pour la population générale. Ces pathologies posent un problème de santé publique et de prévention. Individuellement, leur gravité est variable avec une reconnaissance médico-légale possible. Leur diagnostic peut être difficile du fait de l'absence d'antécédents bien connus, d'une expression clinique atypique, d'effets combinés à différentes expositions, d'une nocivité d'expression retardée et enfin de pathologies associées. Les rapports de l'AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail) datant de 2006 et 2008 soulignent l'émergence des risques sanitaires induits par le développement de l'utilisation de nanomatériaux et notamment des poudres ultrafines (**AFSSET, 2006, AFSSET, 2008**).

En hygiène du travail, il est important de rappeler que le risque direct pour la santé humaine, soit le risque toxique, résulte de deux facteurs, d'une part la toxicité intrinsèque d'un produit et d'autre part le niveau d'exposition des personnes. De plus, une fois ces matériaux dans l'organisme, ils doivent démontrer un comportement spécifique associé à leur nanostructure (**Oberdorster et al., 2005**). Ainsi, l'évaluation du risque suppose une bonne connaissance de l'identité du danger et de la toxicité des produits (relation dose-réponse), des niveaux d'exposition et de la caractérisation des dangers aux divers postes de travail. Or, dans le cas des nanoparticules, les connaissances sont encore très parcellaires. La **Figure 6** résume les informations et connaissances normalement nécessaires pour l'évaluation du risque, la notion de risque toxique correspondant au produit de la toxicité et de l'exposition.

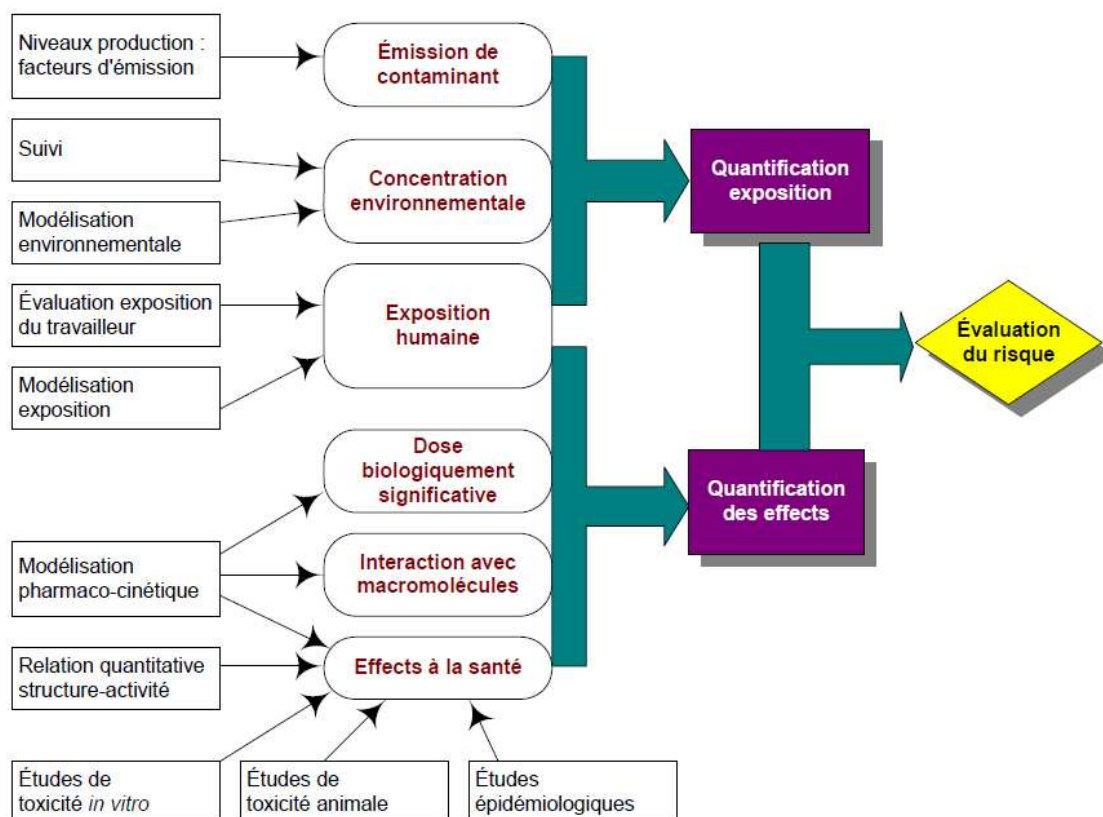


Figure 6 : Approche classique de l'évaluation du risque (Ostiguy et al., 2010).

Ce risque dépend également de la susceptibilité individuelle. La nature des procédés et les modes opératoires conditionnent la possibilité que des nanoparticules entrent en contact avec l'organisme. La qualité du confinement, les moyens de protection et les modes opératoires permettent d'atténuer le risque potentiel. En l'absence de données acquises sur la toxicité, la maîtrise du risque sanitaire repose sur la maîtrise de l'exposition, qui doit être aussi limitée que possible.

L'évaluation globale des risques professionnels est prescrite à tout employeur par l'Article L.230-2 du code du travail et le décret 2001-1016 du 5 novembre 2001 (Directive CEE 89-391). L'employeur qui met en œuvre des produits dangereux doit par ailleurs assurer un niveau d'exposition aussi faible que possible: décret 2003-1254 du 23 décembre 2003 (Directives CEE 98-24, 99-38 et 90-394). Depuis les arrêts de la Cour de Cassation (28.02.2002) sur l'amiante, l'employeur a envers ses salariés une obligation de résultat en matière de sécurité même en l'absence de réglementation spécifique. L'employeur doit donc prendre les mesures de précaution qu'exige la prudence et pourra proposer des équipements de protection afin de préserver la santé de son personnel (L 122-45 Code du Travail).

L'idée même de l'évaluation du risque apparaît pour une fois en même temps que les développements autour des nanotechnologies. La notion de toxicité supposée induite dite « Nanotoxicité » sera présentée plus tard après avoir exposé plus en détail les interactions entre les nanoparticules et le monde vivant.

I.4.2 Réglementations

Actuellement, à l'échelle nationale, européenne ou mondiale, il n'existe aucune réglementation spécifiquement liée à la synthèse et manipulation des nanoparticules. Les industriels travaillant actuellement sur ce type de composés ont généralement deux attitudes opposées : soit ils utilisent les données de sécurité des matériaux massifs ou micrométriques dont sont faites les nanoparticules sans plus de considération pour leurs caractéristiques particulières liées à leur taille nanométrique; soit ils considèrent les nanoparticules comme des substances potentiellement dangereuses à cause de leur taille et les manipulent de façon à limiter l'exposition. Il n'existe presque aucune donnée officielle relative à la toxicité des nanomatériaux. En effet, sur l'ensemble des substances présentes sur le marché, peu d'entre elles ont réellement été testées *in vitro* et *in vivo*.

Deux options concernant la réglementation apparaissent envisageables :

- Adapter des réglementations existantes (REACH ou réglementations sur les produits manufacturés par exemple).
- Etablir un cadre réglementaire spécifique (Nanosafe).

Le système REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) préconise l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques. Cette nouvelle réglementation européenne est entrée en vigueur le 1er juin 2007. Elle impose aux entreprises de prouver qu'elles ne commercialisent pas de produits incluant des substances chimiques dangereuses pour la santé des consommateurs et pour l'environnement. L'objectif de l'Union Européenne est d'améliorer la connaissance des substances chimiques utilisées par l'industrie, d'isoler les substances toxiques pour la santé et l'environnement et de favoriser leur substitution par des produits inoffensifs. REACH s'applique en principe à toutes les substances chimiques, non seulement celles utilisées par les industriels lors de processus de transformation, mais également dans notre vie de tous les jours, par exemple dans les produits de nettoyage, les peintures, les appareils électriques, etc. En tant que substances chimiques, les nanoparticules pourraient relever de cette réglementation. Elles échappent pour l'instant à ce règlement, car REACH inclut des seuils de tonnages annuels de production (1000 tonnes/an) que n'atteignent généralement pas les laboratoires et industries produisant des nanoparticules (TiO₂, SiO₂, nanotubes de carbone). L'intégration des nanoparticules dans la réglementation REACH pourrait se faire par l'extension des dispositions concernant plusieurs familles de substances dites « très préoccupantes » (CMR : Cancérigène, mutagène et toxique pour la reproduction, PBT : Persistant, Bioaccumulable et Toxique, vPvB : très Persistant et très bioaccumulable, perturbateurs endocriniens).

Concernant maintenant la réglementation des produits manufacturés avant mise sur le marché, lorsque les substances sont intégrées à un produit manufacturé, elles sont susceptibles de relever de diverses réglementations relatives à la mise sur le marché des produits les contenant (ex : directives sur les biocides, les pesticides, les médicaments à usage humain et vétérinaire, les produits cosmétiques). C'est alors via le produit tel qu'il est utilisé par un professionnel ou par un consommateur que la nanoparticule manufacturée pourra être évaluée. Mais la réglementation applicable aux produits manufacturés n'est pas non plus très adaptée aux particularités des nanoparticules. Comme le précise le Comité de la Prévention et de la Précaution, lorsque les nanoparticules sont intégrées à un produit manufacturé, les risques qui leurs sont attachés ne font

pas davantage l'objet d'une évaluation spécifique. Par exemple s'agissant des produits cosmétiques, la directive 76/768/CEE pose comme principe général que seuls les produits cosmétiques qui ne sont pas susceptibles de nuire à la santé humaine peuvent être mis sur le marché. Mais cette appréciation se fait indépendamment du procédé de fabrication utilisé et de la taille d'une substance donnée contenue dans les produits cosmétiques.

La recherche sur la production sécurisée des nanomatériaux fait l'objet de programmes spécifiques. Le CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) travaille depuis plusieurs années sur la sécurisation des procédés de production des nanomatériaux. Il conduit une partie de ses recherches dans un cadre européen et coordonne le programme européen Nanosafe. Après Nanosafe 1, programme qui a permis d'établir un état des lieux des risques associés, Nanosafe 2, lancé en 2005 à l'initiative du CEA, implique 24 organismes de recherche et industriels. Ce projet est financé par la Commission Européenne dans le cadre du 6ème PCRD (Programme Cadre de Recherche et Développement). Nanosafe 2 ne prétend pas traiter toutes les nanoparticules mais s'attache à un certain nombre de particules et de situations de références afin d'apporter les premières solutions industrielles. Nanosafe 2 s'intéresse à l'ensemble du cycle de vie des nanoparticules : production, conditionnement, stockage, transport, transformation en produit fini et destruction.

Les principaux objectifs de Nanosafe 2 sont donc :

- le développement de méthodes innovantes de détection et de traçabilité dans l'air et dans l'eau et la mise au point de méthodes d'étude de la toxicité et de la propagation des particules dans les milieux et les organes, ainsi que l'élaboration d'un modèle toxicocinétique ;
- l'acquisition d'une bonne connaissance et compréhension des phénomènes toxiques associés à la production et l'utilisation des nanoparticules, la création d'une base de données des connaissances disponibles ;
- le développement de technologies permettant de limiter l'exposition aux nanoparticules et les rejets dans l'environnement ;
- l'évaluation des impacts sociétaux et environnementaux ;
- la contribution à de nouvelles réglementations et normalisations pour les nanoparticules ;
- la législation et la réglementation applicables aux nanotechnologies, dialogue avec la société civile et recommandations aux pouvoirs publics.

II. Interactions particules/vivant

II.1 Pénétration des particules dans l'organisme

Il existe différentes voies naturelles d'entrée des nanoparticules dans l'organisme : la voie respiratoire, la voie digestive et la voie cutanée. La voie respiratoire étant la plus importante, elle est aussi par conséquent la plus étudiée (**Hervé-Bazin, 2007**). Ces voies naturelles s'opposent aux voies intentionnelles (injections volontaires), dans le cadre thérapeutique ou diagnostique par exemple. Il existe aussi des phénomènes de transport et de translocation très variables en fonction des nanoparticules. Le phénomène de translocation des nanoparticules correspond à leur déplacement vers les organes via la circulation sanguine une fois les barrières biologiques franchies. Les nanotechnologies peuvent être à l'origine d'expositions aiguës (forte concentration pendant un temps court), ou le plus souvent d'expositions chroniques (faibles concentrations sur de longues durées). La **Figure 7** présente de façon schématisée les différentes voies d'exposition et de pénétration des nanoparticules dans l'organisme humain (**Stern and McNeil, 2008**).

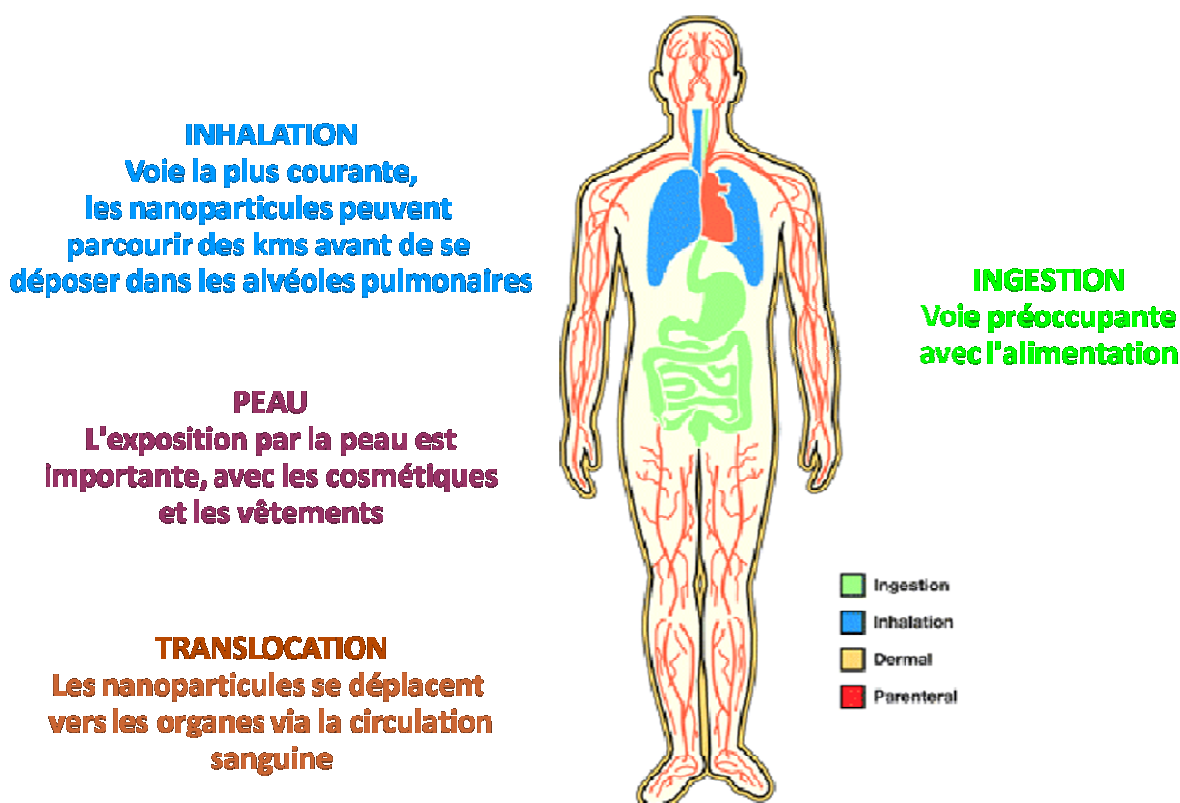


Figure 7 : Schéma récapitulatif des différentes voies d'exposition et de pénétration des nanoparticules dans l'organisme humain (Stern 2008).

Dans la suite de ce chapitre, nous allons détailler ces différentes voies en nous concentrant un peu plus précisément sur la voie respiratoire à laquelle s'intéresse plus particulièrement notre équipe de recherche.

II.1.1 Voie respiratoire

II.1.1.1 Données anatomiques

En anatomie humaine, les voies aériennes sont des voies de conduction permettant le passage de l'air depuis le nez et la bouche vers les poumons et les alvéoles pulmonaires au cours de la ventilation (respiration). Ces voies aériennes peuvent être divisées en deux grands secteurs anatomiques : l'arbre bronchique et le poumon périphérique. Ces deux secteurs sont continus mais diffèrent par leur structure histologique, leur fonction, les procédures d'exploration et les pathologies qui peuvent les atteindre. On distingue les voies extra-pulmonaires et intra-pulmonaires.

Les voies aériennes se composent donc des éléments suivants (**Figure 8**):

- Les voies aériennes extra-pulmonaires : la cavité nasale, le pharynx (carrefour aéro-digestif réparti entre naso- et oro-pharynx), le larynx séparé de l'œsophage par l'épiglotte et la trachée. Les voies aériennes supérieures ou région ORL (Oto-Rhino-Laryngologie) désignent les voies respiratoires situées au-dessus du larynx.
- Les voies intra-pulmonaires : les deux bronches souches qui proviennent de la division en deux branches de la trachée donnent naissance à une succession de divisions bronchiques, aboutissant aux bronchioles terminales qui débouchent dans les alvéoles pulmonaires.

Sont également annexés à l'appareil respiratoire, les deux plèvres, le diaphragme et les muscles intercostaux qui assurent les mouvements respiratoires. L'homme possède deux poumons séparés l'un de l'autre par le médiastin. Ils sont posés sur le diaphragme et protégés par la cage thoracique. Le poids moyen d'un poumon est de 0,9-1 kg contenant 40-50% de sang.

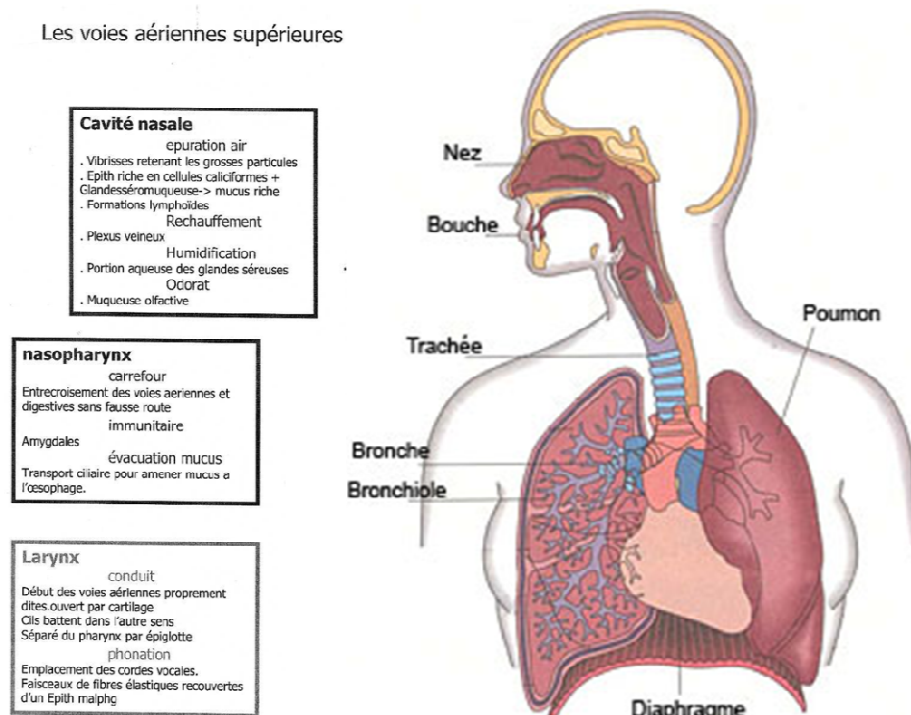


Figure 8 : Schéma de l'appareil respiratoire humain (Adapté de scientific.forumactif.net).

Les acini pulmonaires correspondent aux unités morpho-fonctionnelles de l'appareil respiratoire dans lesquelles les alvéoles pulmonaires (**Figure 9**) forment le support des échanges gazeux. Leur structure histologique est adaptée à cette fonction essentielle d'hématose (échange oxygène/gaz carbonique).

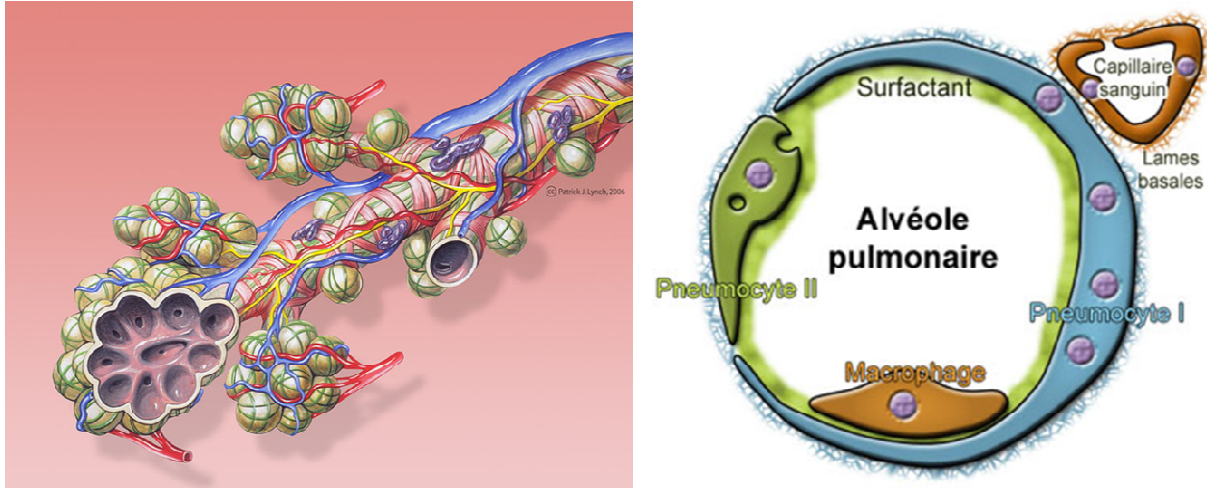


Figure 9 : Schéma d'une bronchiole terminale ouverte sur un acinus et coupe transversale d'une alvéole pulmonaire (Adapté de wikipedia .org et academic.ru).

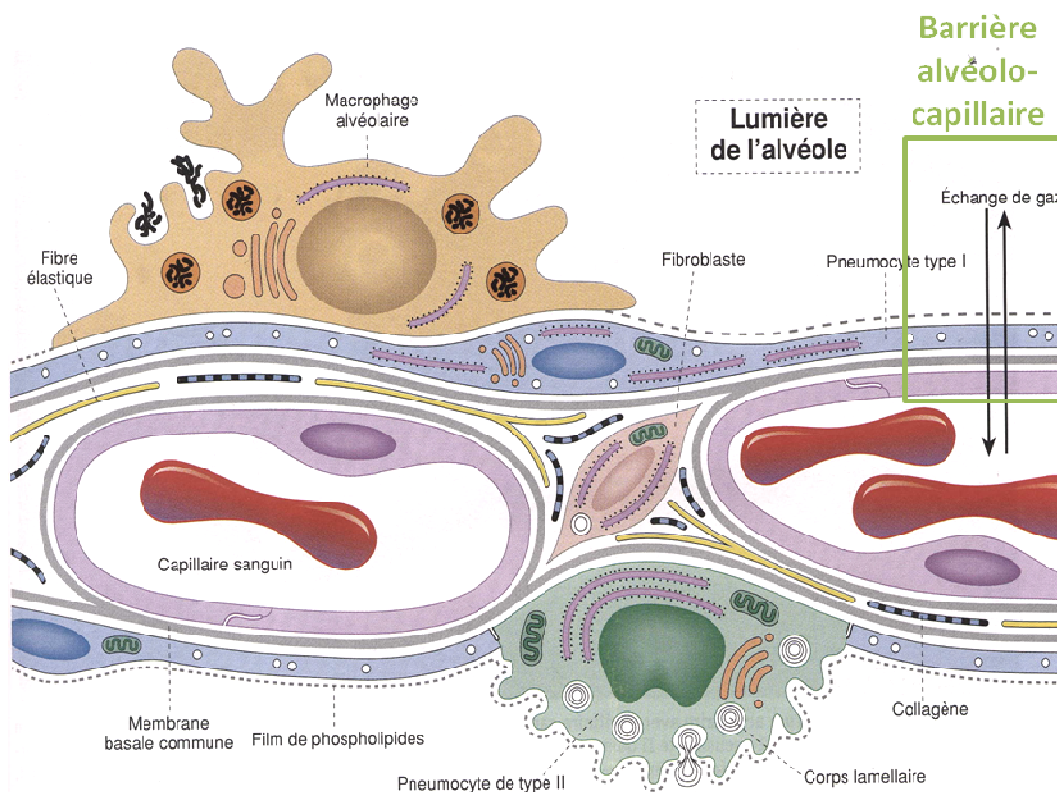


Figure 10 : Schéma de la paroi inter-alvéolaire. La barrière alvéolo-capillaire correspond à la zone fonctionnelle et représente environ 30% de la paroi (Précis d'histologie, Sobotta Welsch).

La surface d'échange de l'ensemble des 300 millions d'alvéoles représente environ 140 m^2 au niveau desquels 12 000 L d'air sont filtrés pour 6000 L de sang perfusés chaque jour. Les échanges s'effectuent à travers la barrière alvéolo-capillaire. Cette barrière correspond à une unité spécifique de la paroi (environ 30% de la surface) particulièrement fine (de $0,1$ à $0,5 \mu\text{m}$) constituée de quatre éléments : surfactant, voile cytoplasmique du pneumocyte I, membrane basale fusionnée et endothélium capillaire. Son rôle principal est de permettre la diffusion des gaz respiratoires entre l'air alvéolaire et les capillaires sanguins (**Figure 10**).

Dans chaque alvéole on distingue la lumière alvéolaire bordée par un épithélium alvéolaire simple pavimenteux (pneumocytes I et II) et une cloison inter-alvéolaire (interstitium conjonctif) où circule un réseau capillaire abondant. Les pneumocytes I et II ont des fonctions différentes et complémentaires. Les pneumocytes I en tant que constituants de la barrière sont impliqués dans les échanges gazeux tandis que les pneumocytes II sécrètent le surfactant (film protecteur permettant de résister à la pression des gaz notamment) et permettent le renouvellement de l'épithélium. On trouve aussi d'autres types cellulaires comme des fibroblastes au niveau du tissu interstitiel conjonctif et des cellules libres à la surface épithéliale : les macrophages alvéolaires.

Les macrophages alvéolaires proviennent de la maturation de monocytes venus du sang après avoir franchi la paroi alvéolaire. Ce sont des cellules libres dans la cavité alvéolaire. Ils exercent leur activité phagocytaire sur les particules inorganiques (poussières) ou organiques (microbes, spores, pollens, etc.) qui atteignent les alvéoles malgré les phénomènes d'épuration liés à l'appareil muco-ciliaire en amont qui tapisse normalement le tractus respiratoire (**Aderem and Underhill, 1999, Allen and Aderem, 1996**). Une fois leur phagocytose accomplie, les macrophages peuvent, soit gagner les bronchioles et être évacués par l'appareil muco-ciliaire, soit se disloquer dans l'alvéole, soit pénétrer dans les cloisons inter-alvéolaires et, par la voie de l'interstitium pulmonaire, gagner les vaisseaux puis les ganglions lymphatiques (**Figure 11**).

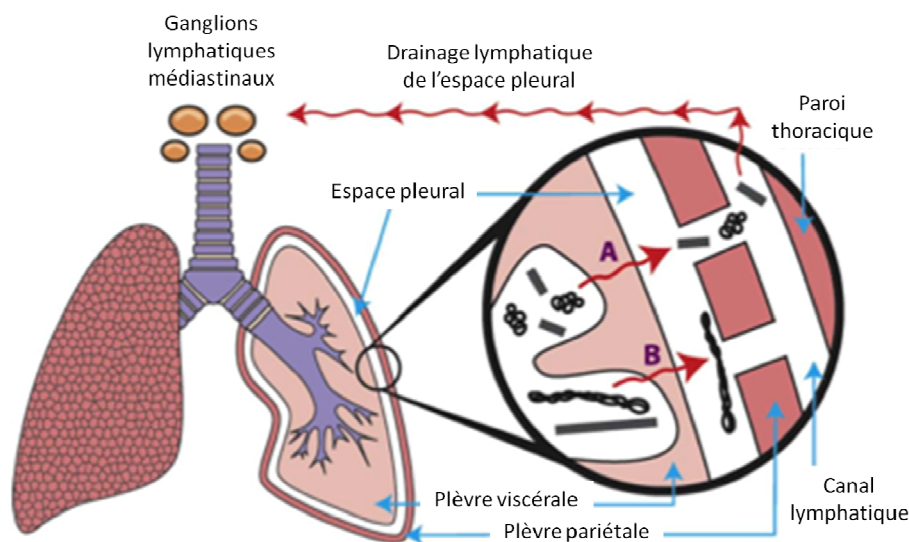


Figure 11 : Schéma du drainage lymphatique de l'espace pleural (Murphy et al. 2011).

Les macrophages sont continuellement transportés le long de l'appareil respiratoire avec un rythme d'épuration supérieur à 2×10^6 macrophages alvéolaires par heure. Ce phénomène est appelé clairance muco-ciliaire (**Lehnert, 1992, Fadok, 1999**). La sécrétion continue de surfactant dans les alvéoles crée en effet un gradient qui provoque le déplacement du film de

surface vers les bronchioles puis vers le haut pour rejoindre le tapis muqueux de l'appareil respiratoire supérieur. Cette couche de mucus se déplace vers le haut de l'appareil au rythme d'environ deux centimètres par minute sous l'action des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. Les cils battent constamment transportant les poussières, les débris cellulaires, les bactéries, les macrophages et les polluants chimiques vers le carrefour aérodigestif au niveau du pharynx où ils seront ensuite déglutis. Il est cependant important de noter que cette prise en charge des particules par les macrophages peut conduire, si l'exposition est poursuivie, à une importante accumulation de particules ainsi qu'à une plus grande interaction de ces particules avec les cellules épithéliales des alvéoles et des bronches (Geiser, 2010).

II.1.1.2 Devenir des particules inhalées

Les particules inhalées peuvent pénétrer par le nez ou par la bouche à l'intérieur du tractus respiratoire et en fonction de différents paramètres physico-chimiques comme notamment leur diamètre aérodynamique, pénétrer plus ou moins profondément pour aboutir dans les alvéoles. Du fait de l'architecture de l'appareil respiratoire, le devenir biologique des nanoparticules aérosolisées qui seront inhalées par un sujet est complexe (Yang et al., 2008). Dans un premier temps, les particules inhalées de taille trop importante seront soit exhalées soit évacuées par le biais de la clairance muco-ciliaire au niveau du carrefour aéro-digestif vers la voie digestive (Geiser, 2010). En fonction des caractéristiques physico-chimiques des particules inhalées (taille, densité, morphologie, caractère hydrophile/hydrophobe, etc.) elles pourront persister dans les différentes régions de l'arbre respiratoire (Geiser and Kreyling, 2010).

Différents mécanismes physiques interviennent lors du dépôt des particules au niveau du tractus respiratoire (*Figure 12*) :

- L'**impaction** est un phénomène lié à l'inertie des particules. Lors d'un changement de direction dans le mouvement du fluide, les particules rencontrent un obstacle et ne peuvent donc suivre fidèlement l'écoulement de l'air. Cet effet est plus important pour les plus grosses particules.
- La **sédimentation** correspond à l'action de la gravité sur les particules, cet effet augmente avec la taille, la densité de la particule et la durée de résidence des particules dans les voies respiratoires.
- L'**interception** se produit lorsque l'extrémité d'une particule, sans se dévier de la trajectoire du fluide, entre en contact avec la paroi d'un conduit où elle se dépose. Ce phénomène peut être significatif pour les particules de formes allongées comme les fibres ou les agglomérats de particules mais négligeable dans le cas de particules sphériques.
- La **diffusion** est due au mouvement brownien des particules, mouvement aléatoire causé par le choc des molécules de l'air sur des particules. Ce mécanisme est prédominant pour les particules inférieures à environ 200-300 nm.
- Les **effets électrostatiques** apparaissent lorsque les particules sont fortement chargées, elles induisent alors une charge de signe contraire sur les voies aériennes, et sont donc attirées par celles-ci, tout en étant soumises à une répulsion avec les particules voisines (dans le cas où celles-ci ont des charges du même signe).

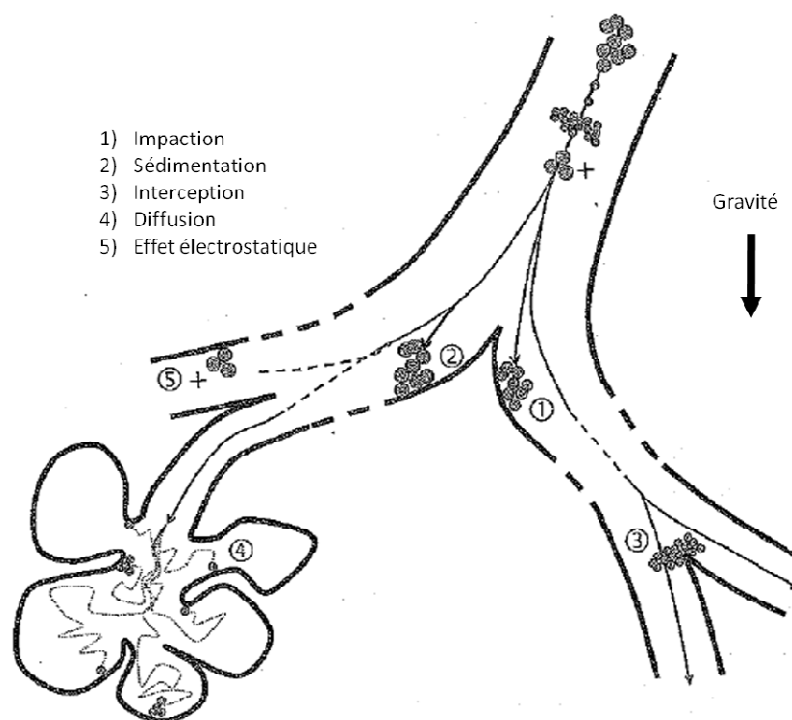


Figure 12 : Illustration des différents mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires (Hervé-Bazin et Collectif 2007).

Selon un modèle mathématique prédictif développé et publié en 1994 par la Commission Internationale de Protection Radiobiologique (CIPR) et s'appliquant aux particules inhalées sous forme de particules bien individualisées à une taille déterminée et non sous forme d'agrégats, le dépôt des nanoparticules inhalées dans le tractus respiratoire dépendrait largement de leur diamètre aérodynamique, ce qui pourrait avoir des conséquences sur leurs effets potentiels. Ce modèle est internationalement reconnu dans le domaine de l'évaluation des doses et est repris comme modèle de référence (Oberdorster et al., 1994).

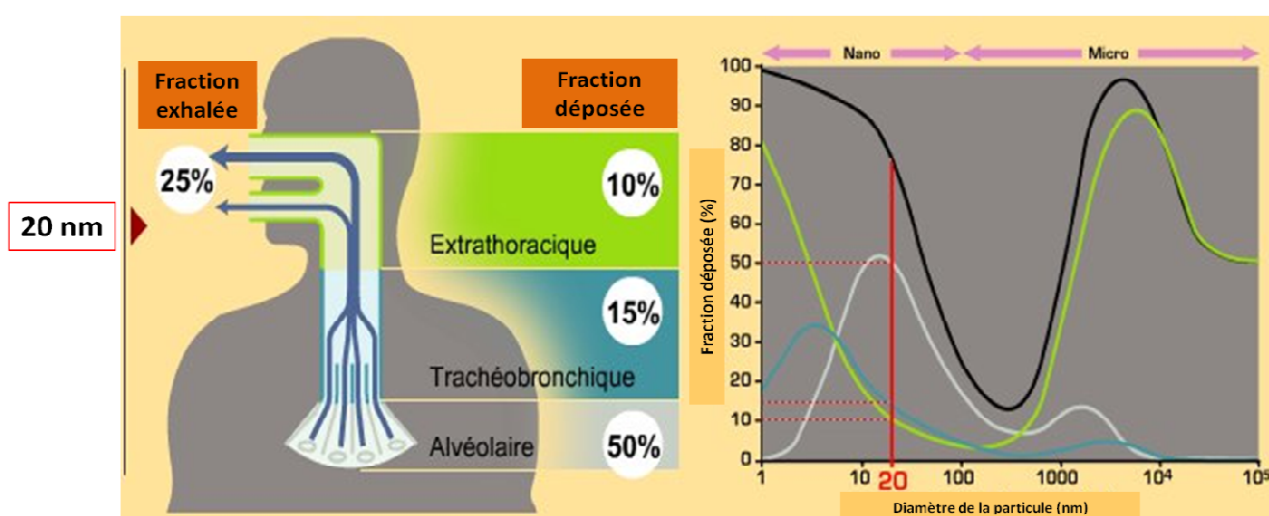


Figure 13 : Prédiction de dépôt dans les voies respiratoires de nanoparticules de 20 nm. La courbe noire correspond à la fraction totale de nanoparticules déposées dans les voies respiratoires. Les courbes verte, bleue et grise correspondent respectivement aux fractions de nanoparticules déposées au niveau extrathoracique, trachéobronchique et alvéolaire (Nanosafe).

A titre d'exemple, la **Figure 13** tracée à partir de ce modèle théorique de dépôt dans les voies respiratoires prédit pour des nanoparticules sphériques de 20 nm de diamètre 25% de nanoparticules exhalées contre 75% déposés dans les voies respiratoires (courbe noire) dont 50% dans le compartiment alvéolaire (courbe grise), 15% dans le compartiment trachéobronchique (courbe bleue), et 10% dans le compartiment extrathoracique (courbe verte).

Les particules de 1 à 10 μm ont un comportement inertiel assez important et vont se déposer dans les différentes parties du tractus respiratoire en fonction de leur diamètre aérodynamique par impaction dans les voies aériennes supérieures (fosses nasales et cavité buccale). Ce comportement inertiel augmente avec la taille des particules mais au dessus de 10 μm la taille devient trop grande et les particules commencent à être exhalées. Les particules de 200 à 500 nm se déposent peu dans les voies respiratoires. Les particules de 10 à 100 nm se déposent principalement dans la région alvéolaire et les particules de taille encore inférieure (moins de 10 nm) se déposent par diffusion dans les différentes parties du tractus respiratoire (**Figure 14**).

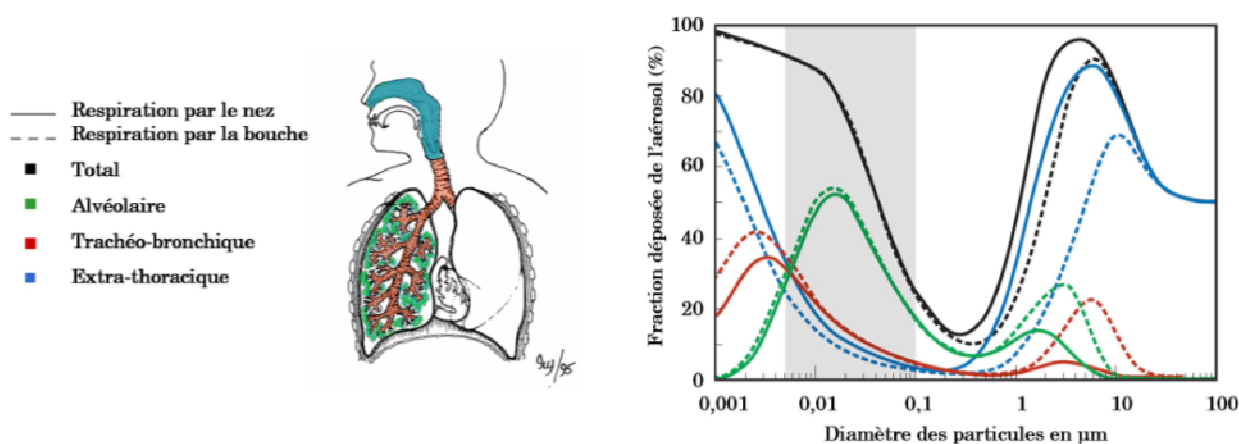


Figure 14 : Pourcentage des particules déposées dans différentes régions de l'appareil respiratoire en fonction de la taille (Witschger et Fabries, 2005).

Le dépôt des particules est donc dépendant de leur diamètre aérodynamique, de leur densité mais aussi de caractéristiques inhérentes à l'individu comme son sexe, son âge, l'activité qu'il est en train de réaliser et sa façon de respirer. En effet on constate sur la **Figure 14** que les résultats sont différents si les particules sont respirées par le nez ou par la bouche (**Brown et al., 2002, Oberdorster et al., 2005, Witschger and Fabriès, 2005**).

Il a été observé que ce sont en général des particules inférieures à 10 μm qui pénètrent jusque dans les alvéoles pulmonaires. Cependant des expériences plus approfondies apparaissent nécessaires au vu de la littérature, notamment développer des modèles de cartographie de dépôt plus précis au niveau des poumons sur des modèles animaux ou humains. Les connaissances dans ce domaine sont encore limitées et notre laboratoire s'intéresse à cette thématique sous un angle original utilisant des modèles de têtes humaines plastinées constitutif d'un modèle de cartographie de dépôt du compartiment ORL, et de poumons *ex vivo* pour étudier la cartographie de dépôt des nanoparticules (**Durand et al., 2011, Durand et al., 2001**).

II.1.2 Autres voies de pénétration

II.1.2.1 Voie digestive

Les nanoparticules peuvent pénétrer de deux façons à l'intérieur du tube digestif. Elles peuvent être ingérées directement avec l'eau, les aliments ou les médicaments par voie orale ou dégluties avec les sécrétions bronchiques grâce au fonctionnement de l'appareil muco-ciliaire décrit précédemment.

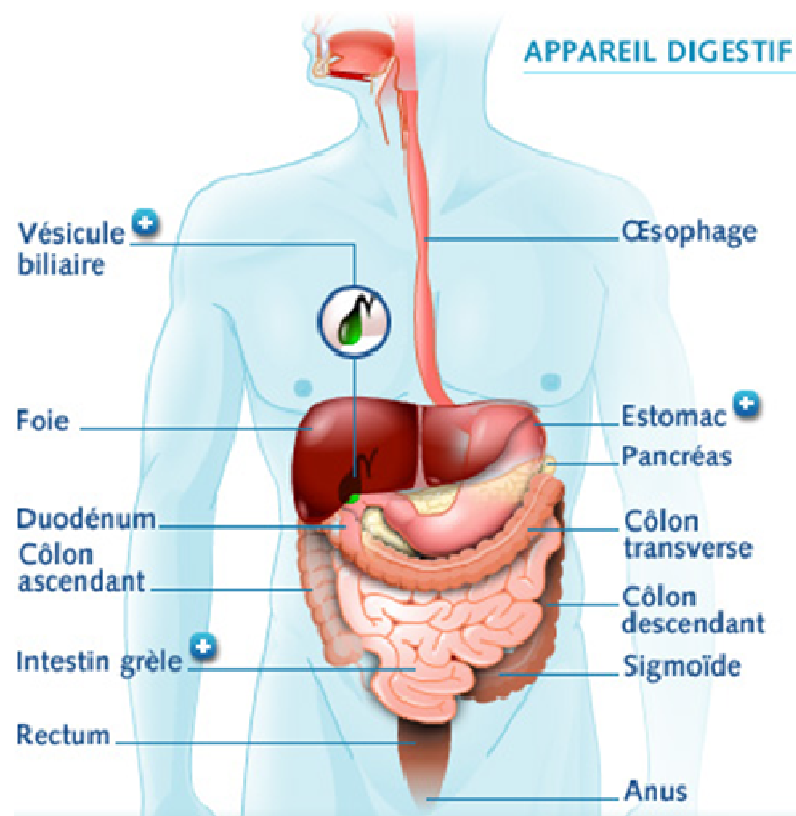


Figure 15 : Schéma de l'appareil digestif humain (futura-sciences.com).

Le système digestif est constitué d'une suite d'organes creux, reliés entre eux pour former un tube qui va de la bouche jusqu'à l'anus (**Figure 15**). À l'intérieur, ce tube est tapissé d'une muqueuse renfermant de petites glandes qui produisent des sucs favorisant la digestion au niveau de la bouche, de l'estomac et de l'intestin grêle. Deux autres organes annexés au tube digestif, le foie et le pancréas, sécrètent des sucs digestifs qui sont déversés dans l'intestin grêle. Bien d'autres facteurs comme les nerfs et le sang jouent également un rôle important dans le processus de digestion des aliments.

Les étapes principales du traitement de la nourriture sont l'ingestion, la digestion, l'absorption et l'élimination.

Le système gastro-intestinal permet la transformation de grosses molécules contenues dans les aliments en nutriments assimilables au niveau du système sanguin. De plus il joue aussi un rôle de défense de l'organisme ainsi qu'un rôle endocrinien. Après avoir été mastiqués, les aliments sont déglutis et dirigés vers l'estomac via l'œsophage. Grâce à l'action mécanique de brassage du muscle gastrique et à la digestion chimique par les sécrétions gastriques, les aliments sont transformés en un fluide, le chyme, qui gagne l'intestin grêle, où les éléments nutritifs subissent une transformation finale pour être absorbés par la muqueuse intestinale et être transférés vers le compartiment sanguin ou lymphatique (**Figure 16**). Les résidus sont ensuite pris en charge par le côlon.

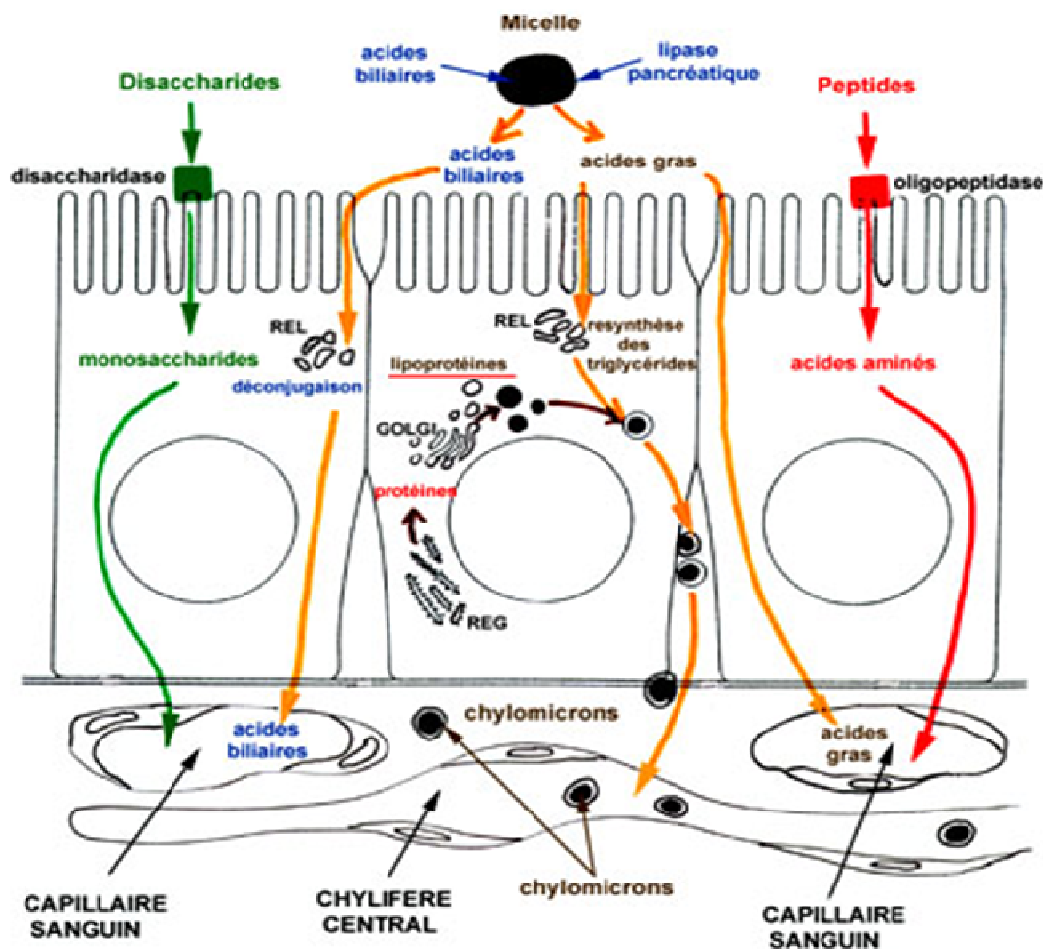


Figure 16 : Schéma de la barrière intestinale présentant le rôle principal des entérocytes dans la fonction d'absorption des nutriments (svt.ac-dijon.fr).

Cette voie apparaît très importante lorsqu'on considère les phénomènes éventuels de recirculation systémique au cours du phénomène de digestion (absorption) ce qui la rend préoccupante.

II.1.2.2 Voie cutanée

La peau est un organe composé de plusieurs tissus (épiderme, derme et hypoderme) et joue, entre autres, le rôle d'enveloppe protectrice du corps humain. C'est l'un des organes les plus importants du corps en terme de surface et de masse (chez l'adulte, environ 2 m² pour 5 kg). Il est cependant intéressant de faire le parallèle avec la surface du poumon (140 m²) beaucoup plus étendue mais aussi beaucoup plus vascularisée.

Des points de vue histologique et anatomique, la peau comprend trois zones principales (**Figure 17**) :

- La partie superficielle, la plus mince, nommée épiderme en contact avec le milieu extérieur. Les notions de peau fine et épaisse dépendent de la différence d'épaisseur de l'épiderme et des caractéristiques de l'épithélium malpighien de surface.
- La partie interne la plus épaisse : le derme.
- Une couche plus profonde : l'hypoderme.

L'ensemble « peau » et phanères (ongles, poils) forme l'appareil tégumentaire assurant des fonctions multiples telles que protection, immunité, perception, thermorégulation, réservoir sanguin et lymphatique et synthèse de la vitamine D.

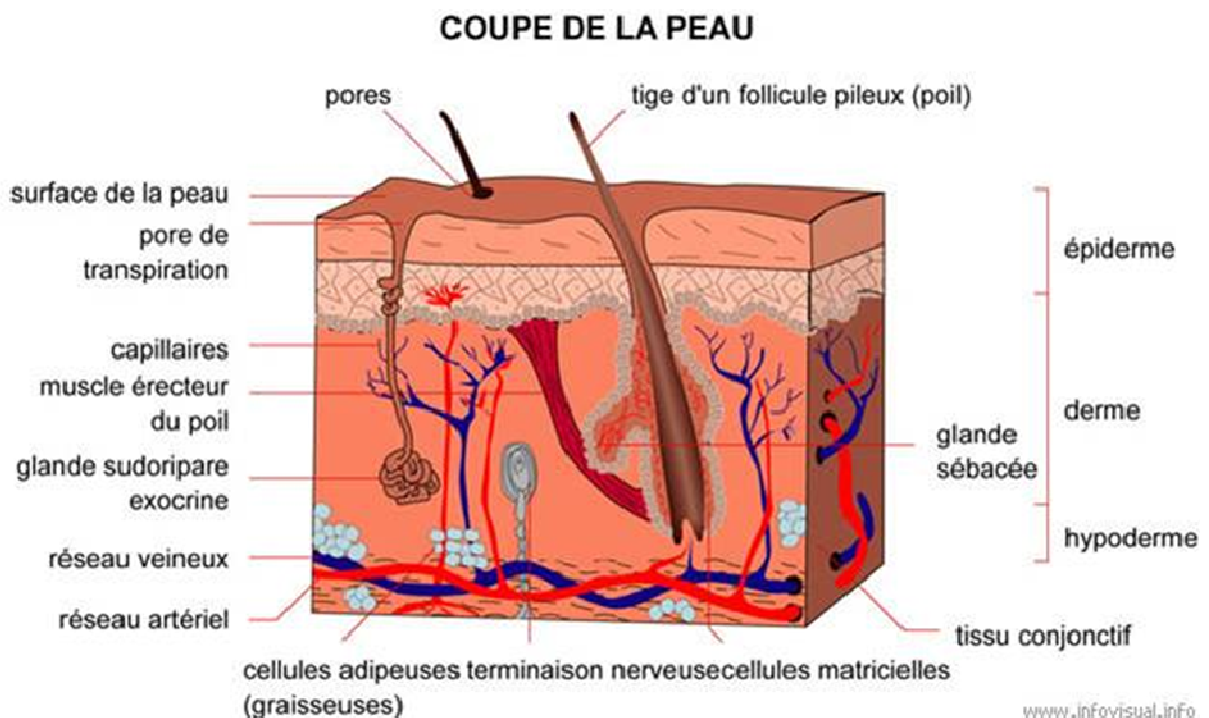


Figure 17 : Schéma de l'appareil cutané humain (www.infovisual.info).

Cette voie de pénétration pour les nanoparticules ne doit pas être négligée. En effet de nombreux produits cosmétiques contiennent des nanoparticules (crèmes solaires, déodorants, dentifrices, rouges à lèvres, etc.) et c'est le premier organe sensible lors de manipulations directes au poste de travail.

Différents facteurs sont susceptibles d'influencer la pénétration cutanée (**Hervé-Bazin, 2007**) :

- La taille : les nanoparticules de taille inférieure à 100 nm (ordre de grandeur des virus) pourraient avoir des facilités à passer la barrière cutanée pour atteindre le derme qui est riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, en nerfs sensitifs et en cellules dendritiques.
- Les propriétés de surface des particules : les particules utilisées dans les formulations cosmétiques sont généralement traitées en surface pour limiter à la fois la formation de radicaux libres, l'agrégation et améliorer la stabilité dans le temps des formulations. Un revêtement hydrophobe des nanoparticules pourrait favoriser la pénétration cutanée grâce à une affinité plus marquée pour les lipides par exemple.
- L'existence de pores, qui constituent une voie de pénétration préférentielle.
- La présence de sueur, pouvant modifier la surface des particules (dissolution partielle, formation d'espèces chimiques nouvelles, etc.).
- La présence ou non d'une lésion cutanée.

Néanmoins la plupart des études ne montrent pas ou seulement une faible pénétration de nanoparticules dans l'épiderme, sans qu'il y ait de passage dans le derme lorsque celui-ci est intact (**Alvarez-Roman et al., 2004**). L'épiderme semble donc être une barrière efficace pour empêcher la pénétration des nanoparticules mais à condition que celui-ci ne soit pas lésé. En effet des études mettent en avant une pénétration des nanoparticules dans le derme attribuée à des lésions cutanées ou à une ouverture des follicules pileux et non à une diffusion à travers l'épiderme (**Tinkle et al., 2003, Mavon et al., 2007**). Le passage ou non des nanoparticules par la peau n'apparaît donc pas totalement clair et il est probablement dépendant de leurs caractéristiques. De plus, il reste aussi à déterminer, en cas de pénétration, si les nanoparticules restent localisées dans le derme ou si elles sont transloquées vers les capillaires sanguins ou les nerfs sensitifs.

Enfin, les nanoparticules peuvent aussi être injectées intentionnellement dans un organisme par voie intraveineuse ou intramusculaire. C'est le cas par exemple lors de la réalisation de certains vaccins où des particules d'aluminium sont notamment utilisées comme adjuvants.

Cet aspect est aussi très important dans le développement de la nanomédecine et des nanomédicaments (**Dobrovolskaia et al., 2008, Serda et al., 2009a**).

II.1.3 Translocation systémique des nanoparticules

Au vue de la complexité des différentes voies d'internalisation des nanoparticules au sein de l'organisme et de par leur petite taille, les nanoparticules sont capables de passer les barrières biologiques telles que la barrière cutanée, la barrière alvéolo-capillaire, la barrière intestinale, la barrière hémato-encéphalique ou encore la barrière hémato-testiculaire, et probablement se retrouver de façon systémique dans tout l'organisme via les circulations sanguine et lymphatique (**Figure 18**).

Comme cela a été souligné précédemment, des études ont révélé que certaines particules ultrafines pouvaient traverser les épithéliums (comme par exemple l'épithélium alvéolaire) et

rejoindre les tissus par translocation interstitielle (Terzano et al., 2010, Yacobi et al., 2010, Oberdorster et al., 1992, Oberdorster et al., 2000). Une fois l'épithélium franchi, une fraction des particules pourra rejoindre les ganglions lymphatiques (drainage lymphatique) ou le secteur sanguin (Ferin et al., 1992, Nemmar et al., 2002, Nemmar et al., 2006, Kreyling et al., 2009).

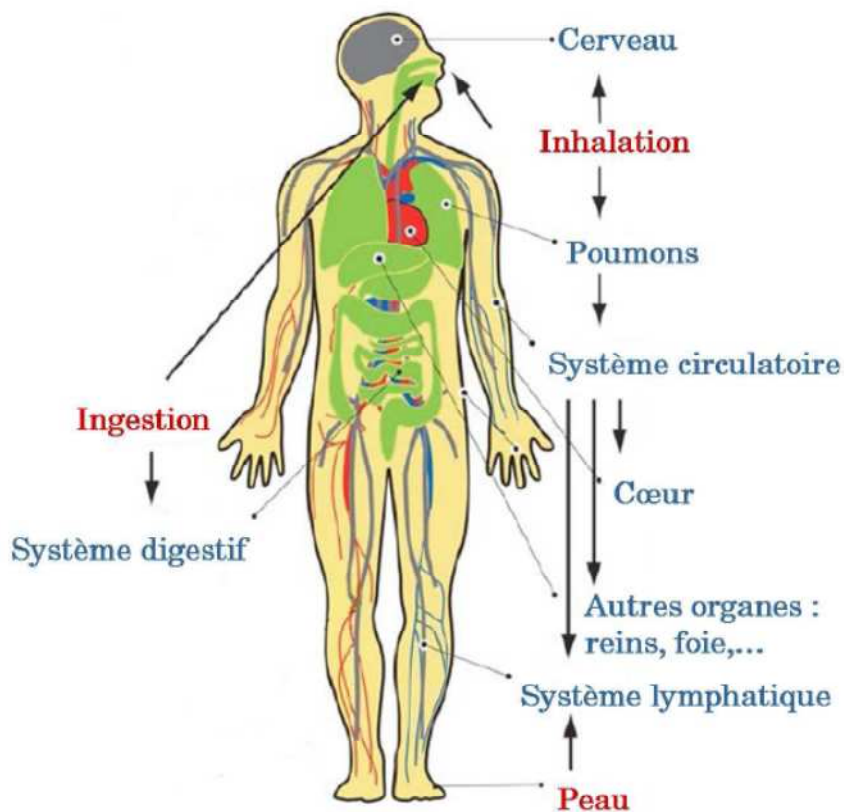


Figure 18 : Schéma du corps humain avec les voies d'exposition aux nanoparticules et les disséminations préférentielles (Buzea et al. 2006).

Ainsi de nombreux travaux sont en cours pour mieux comprendre les translocations au travers de la barrière hémato-encéphalique (Oberdorster et al., 2004, Oberdorster et al., 2009) et d'autres organes tel que l'appareil reproducteur humain (impact des nanoparticules sur la fertilité). Dans ce contexte, notre équipe travaille sur la biopersistance et la biodistribution testiculaire de nanoparticules d'aluminium utilisées comme adjuvants vaccinaux, après injection intramusculaire sur un modèle de souris, ainsi que sur l'évaluation de la charge nanoparticulaire dans le plasma séminal humain (Klein, 2011).

Selon Oberdörster et al. l'analyse globale des travaux montre que la taille de la particule, sa réactivité de surface et peut être sa charge, gouvernent sa translocation à travers les couches cellulaires et endothéliales (Oberdorster et al., 2005).

Meiring et al. (Meiring et al., 2005) ont souligné les points suivants :

- Il existe plusieurs mécanismes de translocation. L'internalisation de particules dans une cellule peut survenir par différentes voies (puits à clathrine, pinocytose, cavéoles, etc.). Ceci permet d'imaginer la possibilité d'un passage transcytotique rapide pour les particules inférieures à 60 nm.

- Les données permettant d'évaluer l'importance de la translocation ne sont pas convergentes, la translocation étant très faible dans certains cas (particules d'iridium marquées (**Kreyling et al., 2002**)), notable dans d'autres (particules ultrafines de carbone marqué (**Oberdorster et al., 2002**)).
- Les phénomènes d'inflammation ont une influence sur la translocation.

La taille et la charge de la particule jouerait également un rôle important (**Limbach et al., 2005**). Certains ont signalé une importante internalisation par la cellule pour des particules aux alentours de 50 nm de diamètre (**Chithrani et al., 2006, Osaki et al., 2004**). Il semble que les particules ultrafines, en deçà d'une taille estimée à environ 200 nm, pénètrent dans les cellules par des mécanismes passifs (**Geiser et al., 2005**).

Des études de biodistribution sont nécessaires afin de mieux appréhender ces phénomènes (**Stark, 2011, Dobrovolskaia et al., 2008**).

La **Figure 19** récapitule les voies que peuvent emprunter les nanoparticules au sein de l'organisme humain.

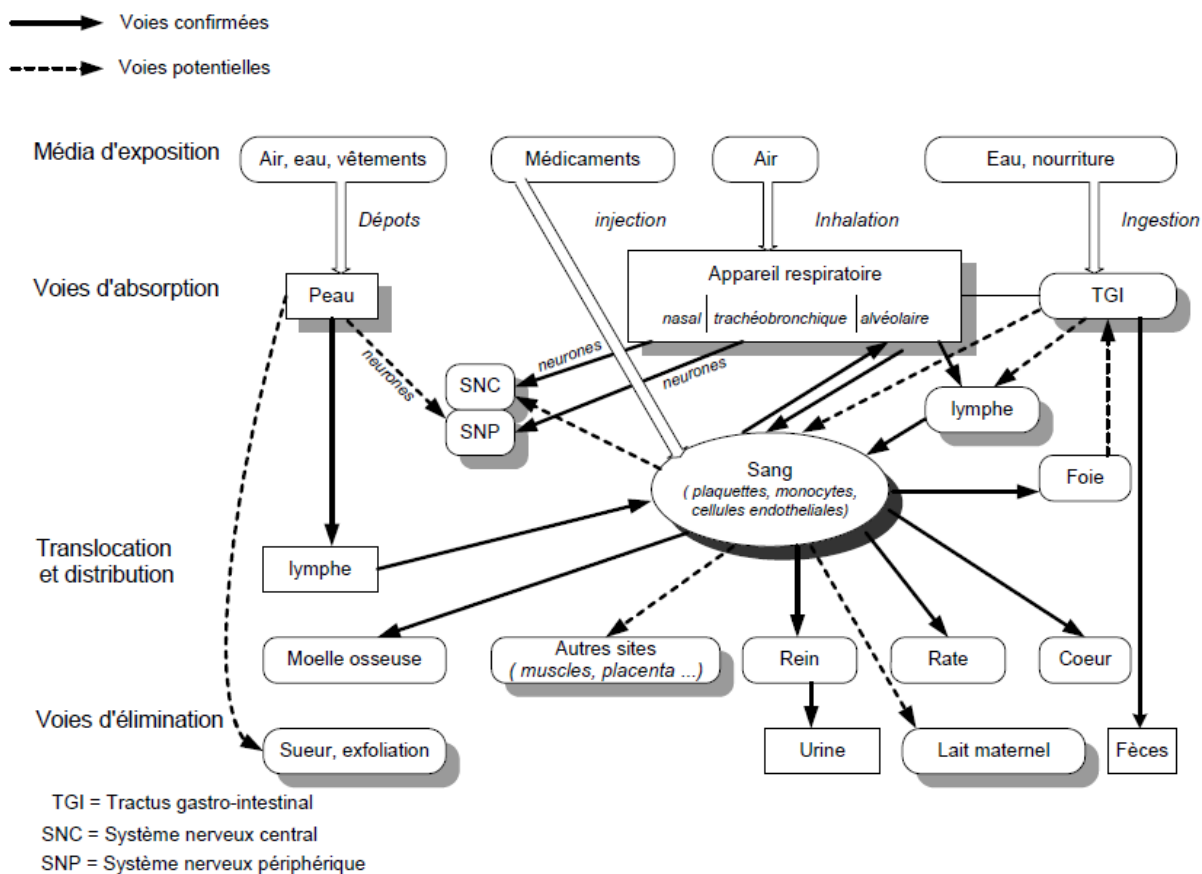


Figure 19 : Principales voies de biodistribution des nanoparticules (Traduit de Oberdörster et al. 2005).

II.2 Processus d'internalisation cellulaire des nanoparticules

II.2.1 La cellule et le modèle macrophage

Après avoir pénétré au sein de l'organisme humain, les nanoparticules peuvent entrer en contact direct avec les tissus et les cellules. La cellule est l'unité de base de la vie et l'Homme adulte est constitué d'environ 30×10^{12} cellules qui pour la plupart sont organisées en tissus et organes. La structure de base d'une cellule est présentée dans la **Figure 20**. De façon générale, une cellule possède un noyau (parfois plusieurs), une membrane plasmique et un cytoplasme dans lequel on trouve différents organites (mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, lysosomes, etc.) nécessaires à son fonctionnement.

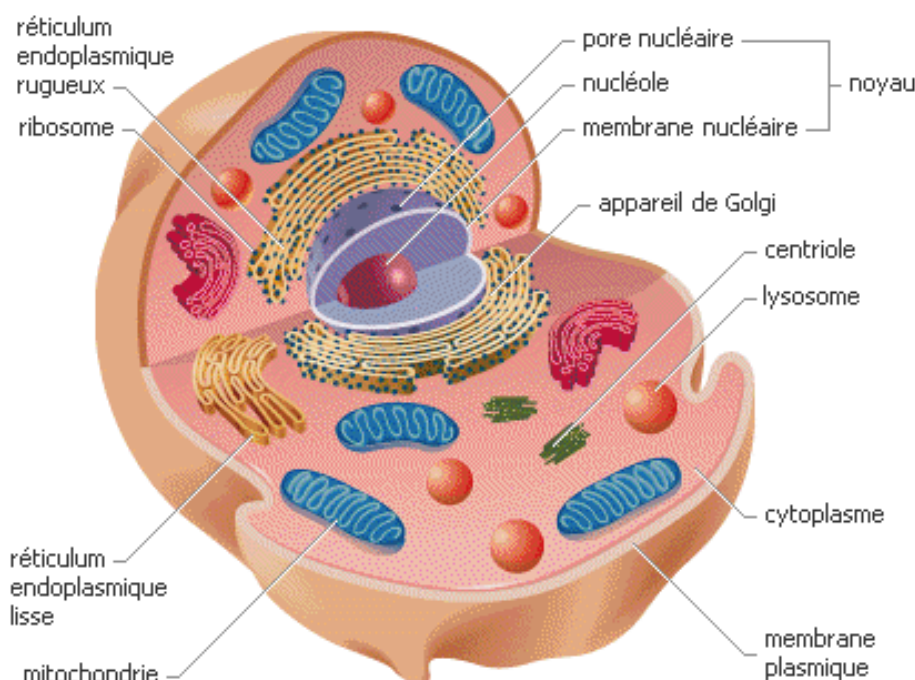


Figure 20 : Structure d'une cellule eucaryote (Encyclopédie Encarta).

Il existe de très nombreux types cellulaires dans un organisme humain. Comme nous le verrons par la suite il existe différents modes d'internalisation des nanoparticules dans les cellules, mais dans ce contexte, un type cellulaire particulier se distingue. Ce sont les macrophages, cellules du système immunitaire très présentes au niveau des tissus et des muqueuses de façon générale et tout particulièrement en surface de l'épithélium alvéolaire comme nous l'avons vu précédemment. En effet, ces cellules sont dotées d'une activité particulière de phagocytose sur laquelle nous reviendrons, qui leur permet d'internaliser des particules antigéniques dont les nanoparticules. De plus, au vu de l'architecture du tractus respiratoire, et selon les données de la littérature, il apparaît que les macrophages sont la première cible potentielle *in vivo* des particules inhalées. Pour ces différentes raisons, ce travail de thèse s'est donc essentiellement focalisé sur ce type cellulaire et plus particulièrement sur un modèle *in vitro* de macrophages murins (lignée cellulaire RAW 264.7).

Les macrophages constituent une famille de cellules ubiquitaires et polymorphes qui se différencient à partir de monocytes sanguins qui sont produits dans la moelle osseuse au cours du processus d'hématopoïèse (**Figure 21**) et qui exercent l'essentiel de leurs fonctions de défense de l'organisme dans les tissus conjonctifs.

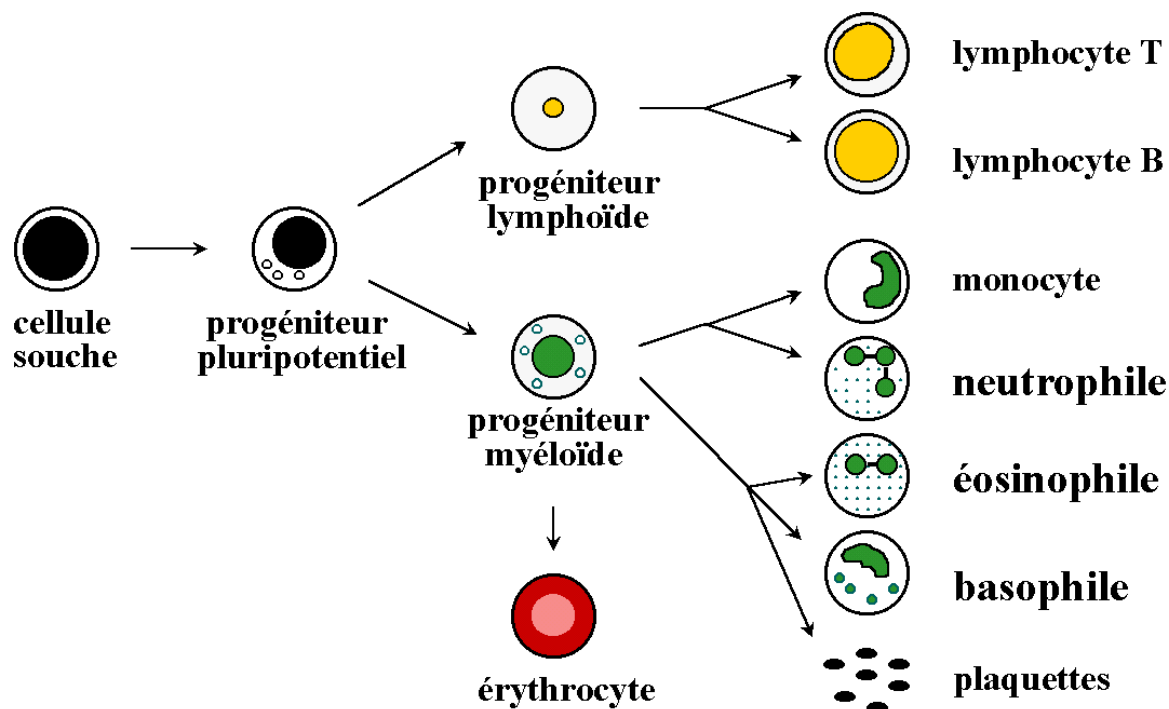


Figure 21 : Schéma simplifié du processus d'hématopoïèse (unites.uqam.ca).

Leur morphologie peut varier légèrement selon leur localisation anatomique. Ce sont de grosses cellules ovalaires d'environ 25 µm de diamètre, avec des prolongements cytoplasmiques sous forme de pseudopodes ou de voiles ondulants (**Figure 22**). Le noyau est réniforme ou encoché, la chromatine peu condensée. Le cytoplasme est faiblement éosinophile, riche en inclusions : organites de synthèse protéique, lysosomes primaires et secondaires, corps étrangers phagocytés formant des vacuoles parfois de très grande taille, caractéristiques du phénomène de macrophagie. Le cytosquelette est très développé, en rapport avec l'extrême mobilité de cette cellule.

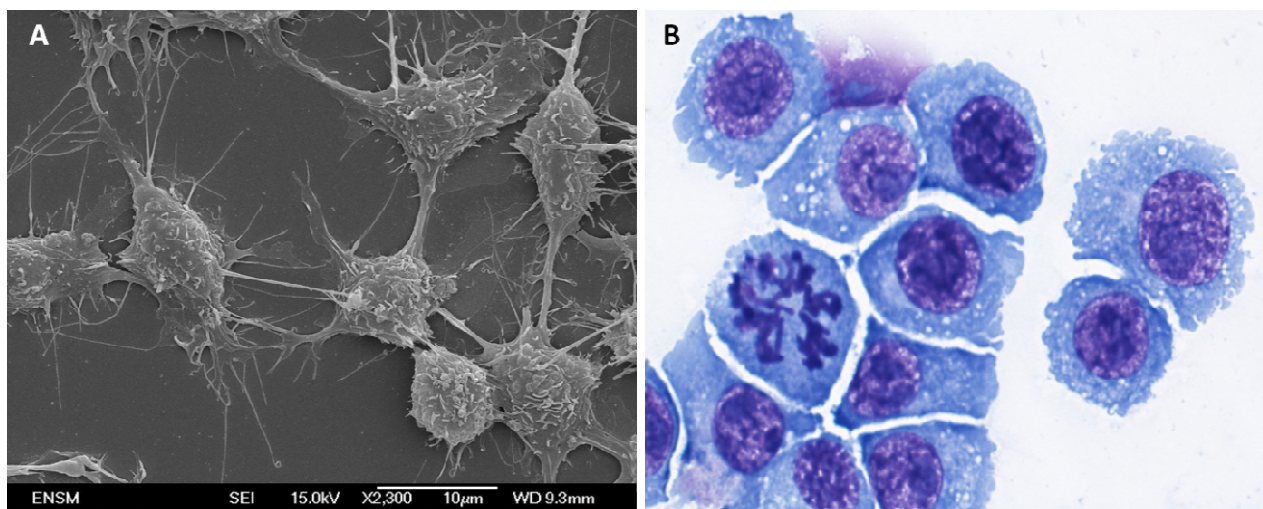


Figure 22 : Images réalisées en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie photonique après coloration cytologique par la méthode de MGG (B) sur des macrophages de la lignée RAW 264.7.

Bien que tous les macrophages partagent une origine commune monocyttaire leurs potentialités et leur morphologie peuvent varier selon leur localisation. Leur classification est indiquée dans le **Tableau 3**.

Nom	Localisation	Remarque
Monocyte	Sang	Forme immature circulante
Histiocyte	Tissus conjonctifs lâches	Peu actif
Cellule de Küpffer	Capillaires sinusoides du foie	50% des macrophages
Macrophage des tissus hématopoïétiques	Tissus myéloïde et lymphoïde	Aide à l'hématopoïèse
Macrophage alvéolaire	Surface alvéolaire du poumon	Cellule à poussière
Macrophage des séreuses	Plèvre, péritoine	
Microglie	Tissu nerveux	
Ostéoclaste	Os	Résorption osseuse
Cellule de Hofbauer	Placenta	
Cellules épithélioïdes	Granulome inflammatoire chronique	Amas compact de macrophages
Cellules géantes	Granulome inflammatoire chronique	Macrophages fusionnés

Tableau 3 : Classification des macrophages (Histologie, Jean Pierre DADOUNE, Médecine-Sciences Flammarion).

Les macrophages sont impliqués dans tous les grands mécanismes de défense de l'organisme contre les agents étrangers. Ils peuvent agir par phagocytose, sécrétion de substances toxiques ou déclenchement de la réaction immunitaire. Il existe plusieurs sources biologiques possibles pour ce modèle cellulaire dans le cadre de l'étude de l'appareil respiratoire. Différents modes d'obtention de cette fraction de macrophages conduisent à des approches expérimentales variées :

- Le modèle animal soumis à des conditions expérimentales particulières (modèle *in vivo*) permet d'obtenir, après sacrifice de l'animal, des prélèvements cellulaires ou tissulaires.
- La méthode *ex vivo* utilise des macrophages provenant d'animaux ou de patients après recueil par lavage broncho alvéolaire (LBA) puis mise en culture dans diverses conditions expérimentales.
- La méthode *in vitro* utilise des lignées cellulaires commerciales de macrophages.

Afin de disposer de conditions expérimentales reproductibles et d'un matériel cellulaire en quantité et disponibilité adéquates, les lignées de macrophages apparaissent comme le modèle le plus approprié pour des études *in vitro* (méthode retenue pour notre étude). De plus, la mise en culture de ces lignées est bien contrôlée tandis que les macrophages issus de LBA sont assez délicats à maintenir de façon stable en culture, avec des niveaux de viabilité cellulaire plus aléatoires et sont par ailleurs obtenus dans un contexte pathologique.

II.2.2 Trafic intracellulaire

II.2.2.1 Les membranes biologiques

Elles sont particulièrement sollicitées dans les mécanismes d'internalisation des particules.

Ce sont des structures délimitant les cellules et les organites intracellulaires (mitochondries, noyau, lysosomes, etc.). Le rôle premier de ces membranes est de permettre des compartimentations. Cette fonction est dévolue aux lipides membranaires, l'un des deux composants principaux des membranes avec les protéines. Les lipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une partie polaire et une partie apolaire. En milieu aqueux, l'organisation la plus stable des lipides est celle qui permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes et les molécules d'eau. Les lipides s'organisent le plus souvent en bicouche formant une vésicule close qui sépare un compartiment interne aqueux du milieu aqueux externe ce qui est le propre d'une membrane biologique (**Figure 23**).

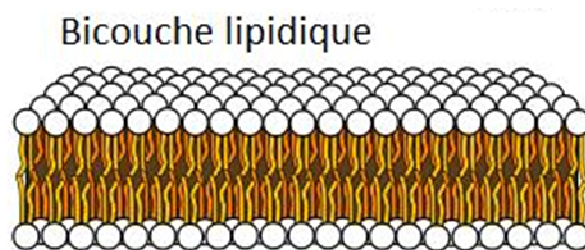


Figure 23 : Schéma de la bicouche lipidique constituant les membranes biologiques (Adapté de *futura-sciences.com*).

La présence d'une structure close continue empêche le libre passage de macromolécules d'un compartiment à un autre. De plus, l'existence de la partie apolaire au centre de la bicouche bloque pratiquement toute diffusion d'ions inorganiques (K^+ , Na^+ , Cl^- , etc.) et freine considérablement la diffusion de solutés organiques polaires (sucres, acides aminés, etc.). Seuls quelques solutés très hydrophobes diffusent librement et rapidement à travers la bicouche (certaines hormones stéroïdes). Les seconds constituants majeurs des membranes sont les protéines classées en deux grandes catégories : extrinsèques (réactions d'interface) et intrinsèques (permettent le transport de matière et le transfert d'information).

Les membranes plasmiques sont le lieu privilégié des échanges entre les milieux extra- et intracellulaires. Le transfert d'information dépend de récepteurs qui fixent des messagers extracellulaires (hormones, neurotransmetteurs). Le transport de matière (solutés organiques, ions organiques) est catalysé par des transporteurs et des canaux. Il en est de même dans les membranes d'organites intracellulaires. Une membrane donnée possède ainsi sa propre collection de récepteurs, transporteurs et canaux lui conférant une spécificité dans les domaines du transfert d'information et du transport.

Les différents constituants d'une membrane (lipides, protéines) ne sont pas reliés entre eux par des liaisons de covalence. Les interactions lipides-lipides et lipides-protéines sont de nature hydrophobe au centre de la membrane, polaire aux interfaces. Elles se font et se défont continuellement. De ce fait, les lipides et les protéines sont animés de mouvements de diffusion-migration conférant à la membrane un caractère dynamique. La propriété de base d'une membrane

est d'être imperméable, mais elle permet aussi des fusions membranaires qui constituent des mécanismes essentiels dans le déroulement de divers processus physiologiques vitaux tels que la division cellulaire, la fertilisation, l'endocytose, l'exocytose et le transport intracellulaire. La fusion nécessite un contact étroit entre les membranes puis leur coalescence ultérieure (**Figure 24**).

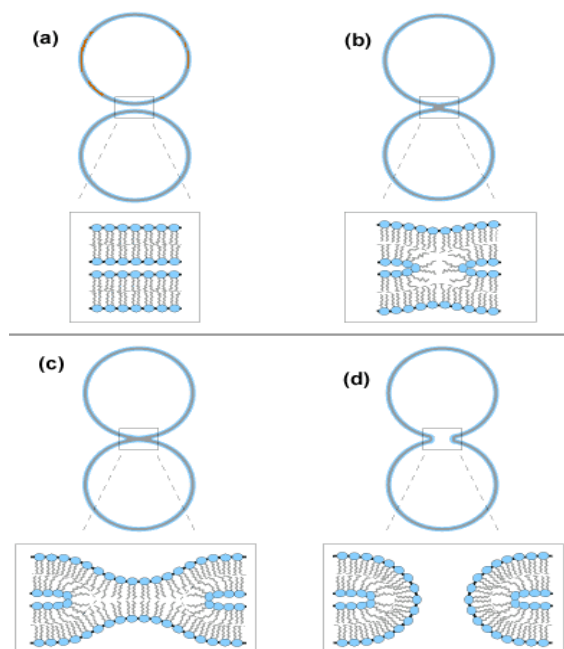


Figure 24 : Fusion membranaire (a et b). Hémifusion (c) et pore de fusion (d) (Li Yang and Huey Huang model 2002).

Enfin il est intéressant de noter qu'il existe pour les membranes, des phénomènes de transport spontanés appelés transport passif et transport facilité. Ces transports spontanés de solutés s'effectuent à travers la membrane, des régions de concentration élevée vers les régions de concentration faible pour atteindre un équilibre. En transport passif, un soluté franchit la bicouche lipidique sans interaction spécifique avec un composé membranaire. Le soluté se dissout dans la membrane à partir d'un des deux compartiments aqueux en fonction de son affinité plus ou moins grande pour la phase lipidique hydrophobe. Il diffuse dans la membrane entre les deux compartiments aqueux de manière aléatoire avant de se redissoudre dans l'autre compartiment. D'une manière générale, les membranes sont quand même peu perméables passivement aux métabolites et aux ions organiques. Cette perméabilité est d'autant plus faible que le soluté a un caractère polaire et/ou une taille importante. Comme le transport passif, le transport facilité ne conduit qu'à un transport dans le sens des potentiels électrochimiques décroissants. Il s'agit d'un transport spontané qui ne nécessite aucun apport d'énergie. Des protéines membranaires accélèrent le transport des solutés et des ions. Ce sont soit des transporteurs (solutés organiques et certains ions inorganiques) soit des canaux (ions inorganiques). Ces différents types de transports s'opposent aux transports actifs dépendants d'ATPases membranaires et aux transports actifs secondaires. Ceci permet aux nombreux ions inorganiques et solutés organiques d'être transportés à travers les membranes contre leur gradient de concentration. Ces transports ne sont pas spontanés et sont donc obligatoirement couplés à des transformations spontanées qui fournissent l'énergie nécessaire.

II.2.2.2 Transport vésiculaire et mécanismes d'endocytose

La plupart des organites des cellules eucaryotes limités par une seule membrane échangent des matériaux par transport vésiculaire. Deux directions principales de transport peuvent être identifiées : la voie de l'exocytose et la voie de l'endocytose. C'est ainsi que se font les entrées et sorties de matière au niveau cellulaire (*Figure 25*).

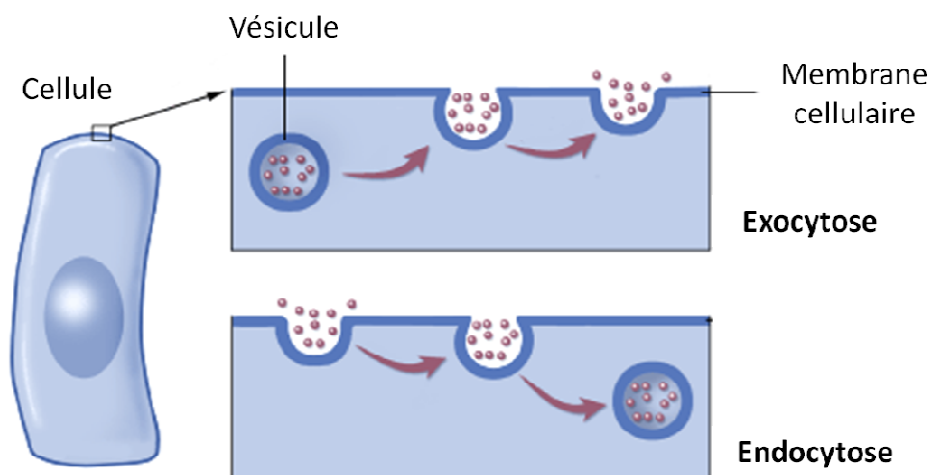


Figure 25 : Schéma des voies d'exocytose et d'endocytose (Traduit de Tovenud).

Lorsque les vésicules doivent se déplacer en intracellulaire sur de longues distances, elles sont transportées grâce à des réseaux spécifiques de filaments du cytosquelette qui seront développées dans la suite du document. La formation des vésicules est le processus au cours duquel une structure est capturée et la membrane lipidique formatée avec l'aide de protéines cytosoliques en un bourgeon qui est ensuite détaché par pincement au cours d'un processus appelé scission. L'assemblage ordonné de protéines cytosoliques en un revêtement à la surface de la vésicule nouvellement formée est responsable de la nécessité qu'a la membrane d'adopter une forme incurvée. Il y a deux types de revêtements qui effectuent cette fonction : les revêtements de clathrine et les revêtements de coatomère. Les vésicules recouvertes de clathrine médient le transport sélectif tandis que le transport le long de la voie par défaut utilise les vésicules recouvertes de coatomère (trafic entre le réticulum endoplasmique et le Golgi).

Nos travaux s'intéressent exclusivement aux phénomènes d'internalisation, or de nombreux types cellulaires possèdent une capacité d'internalisation intracellulaire pour les solutés et les particules (**Aderem and Underhill, 1999**). Ces phénomènes d'endocytose au sens large sont généralement divisés en deux grandes catégories (**Conner and Schmid, 2003**) : la phagocytose pour l'internalisation de grosses particules et la pinocytose pour l'internalisation de fluides et de solutés.

La phagocytose est en général restreinte à des cellules spécialisées, dites cellules phagocytaires, comme les macrophages, les monocytes et les neutrophiles et sera décrite plus en détail dans le paragraphe suivant. C'est un mécanisme dépendant de l'actine permettant l'internalisation de larges particules, en général de taille supérieure à 0,5 μm . L'internalisation des particules est

initiée par l'interaction entre un récepteur spécifique du phagocyte et un ligand à la surface de la particule conduisant à la polymérisation de l'actine, entraînant la maturation du phagosome en phagolysosome. La tubuline semble aussi fortement impliquée dans ce processus.

La pinocytose existe dans tous les types cellulaires selon au moins quatre mécanismes de base : la macro-pinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par les cavéoles et l'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles (**Figure 26**). Les mécanismes basés sur la clathrine sont souvent indépendants de la polymérisation de l'actine et permettent l'internalisation de macromolécules, virus et petites particules.

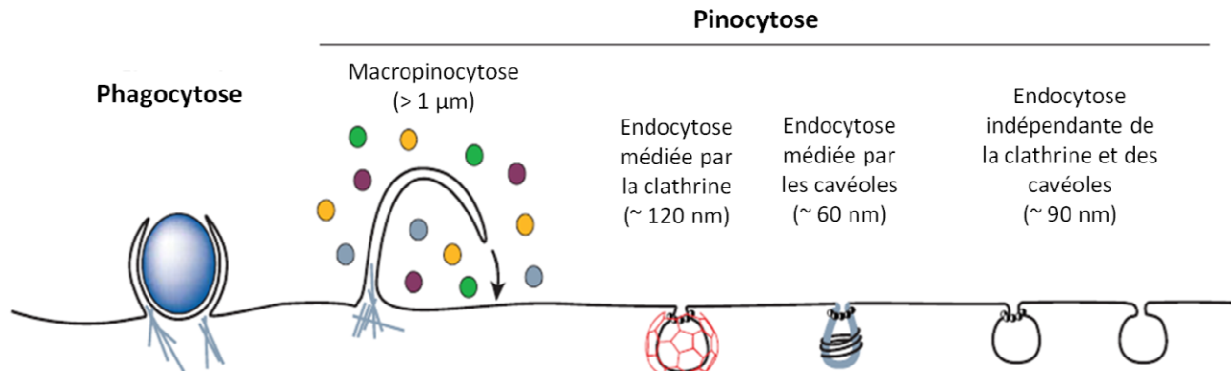


Figure 26 : Les différentes voies d'endocytose (Traduit de Conner et al, 2003).

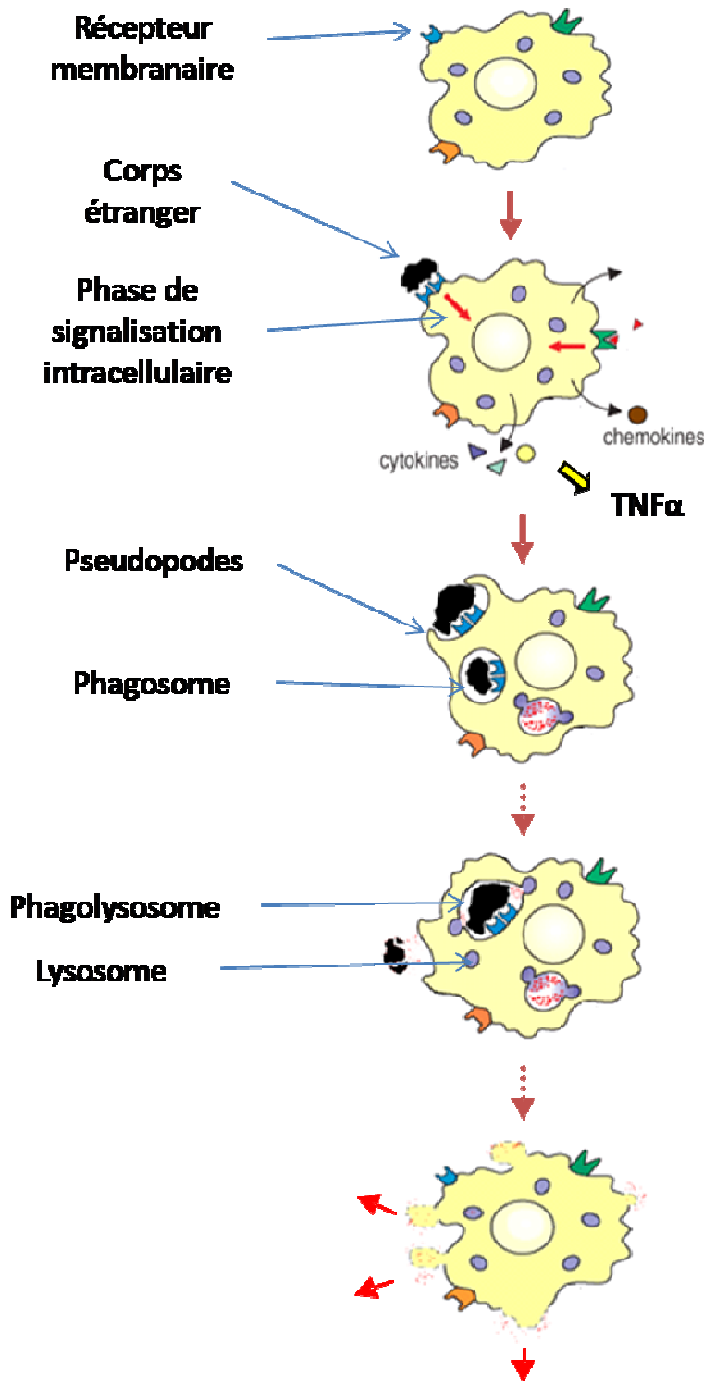
Notre étude s'est plus particulièrement ciblée sur le processus de phagocytose dont le paragraphe suivant s'attachera à décrire les caractéristiques associées à ce mécanisme étant donné le modèle cellulaire de macrophages utilisés. Notre objectif ne concerne pas une étude mécanistique et fonctionnelle mais bien le développement d'une méthodologie de quantification de l'internalisation.

II.2.2.3 La phagocytose

II.2.2.3.1 Les différentes étapes du processus de phagocytose

Les données générales sur la phagocytose indiquent que celle-ci correspond à une forme particulière d'endocytose qui consiste en la capture et l'ingestion des particules solides inertes ou vivantes du milieu ambiant, en général d'un diamètre supérieur à 500 nm (**Allen and Aderem, 1996, Aderem and Underhill, 1999**). Elle est caractérisée par un ensemble d'étapes successives, de l'adhésion, l'internalisation jusqu'à l'éventuelle digestion de particules de diamètre microscopique et le rejet des déchets générés décrits dans la **Figure 27**. Les corps étrangers sont ingérés par de grosses vésicules endocytaires appelées phagosomes. Cette activité constitue un élément essentiel de l'immunité naturelle (**van Oss, 1986**). Pendant longtemps, il a été établi que la phagocytose était la seule fonction des phagocytes (dont les macrophages) et que ces cellules avaient une seule mission, celle d'assurer l'élimination des éléments étrangers à notre organisme. Aujourd'hui, il est établi que les macrophages sont capables d'exercer d'autres fonctions que celle de la phagocytose qui les définissait initialement. Ainsi, ces cellules sont capables de synthétiser, de sécréter des métabolites agissant sur d'autres types de cellules à caractère immunocompétent,

de détruire sans les englober des cellules tumorales, certains parasites, et des cellules normales ou tumorales sensibilisées par des anticorps (**Ravetch and Aderem, 2007**). Les signaux induits permettent de plus d'initier une réaction inflammatoire qui favorise l'efficacité de la réponse immunitaire. Enfin, les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) indispensable pour initier des réactions immunitaires spécifiques médiées par les lymphocytes T.



Macrophage

Chimiotactisme et adhésion

Le macrophage est chimiquement attiré vers le corps étranger à éliminer, entre en contact avec un récepteur membranaire spécifique qui va transduire un signal intracellulaire et déclencher le processus de phagocytose.

Internalisation

Une réorganisation du cytosquelette d'actine conduit à la formation de pseudopodes qui vont englober le corps étranger pour former une nouvelle vacuole intracellulaire : le phagosome.

Digestion

Les lysosomes contiennent des enzymes hydrolytiques et ont un pH naturellement acide. Ils vont fusionner avec le phagosome pour former un phagolysosome. Quand cela est possible le corps étranger est dégradé.

Rejet

Les éléments dégradés sont rejetés dans le milieu extracellulaire par exocytose des vésicules. Les éléments non dégradés persistent dans les macrophages et sont évacués grâce au fonctionnement de l'appareil muco-ciliaire.

Figure 27 : Schéma illustrant les différentes étapes de la phagocytose (Adapté de Boumahdi, 2009).

La phagocytose est donc un processus complexe intervenant dans la réponse immunitaire. Il existe plusieurs modes d'initiation potentiels (**Chimini and Chavrier, 2000**) :

- La phagocytose médiée par les récepteurs Fc γ (particules recouvertes avec des anticorps).
- La phagocytose médiée par le récepteur C3 (particules opsonisées avec des fragments du complément).
- La phagocytose des corps apoptotiques.

La complexité de ces différents mécanismes est résumée dans la **Figure 28**.

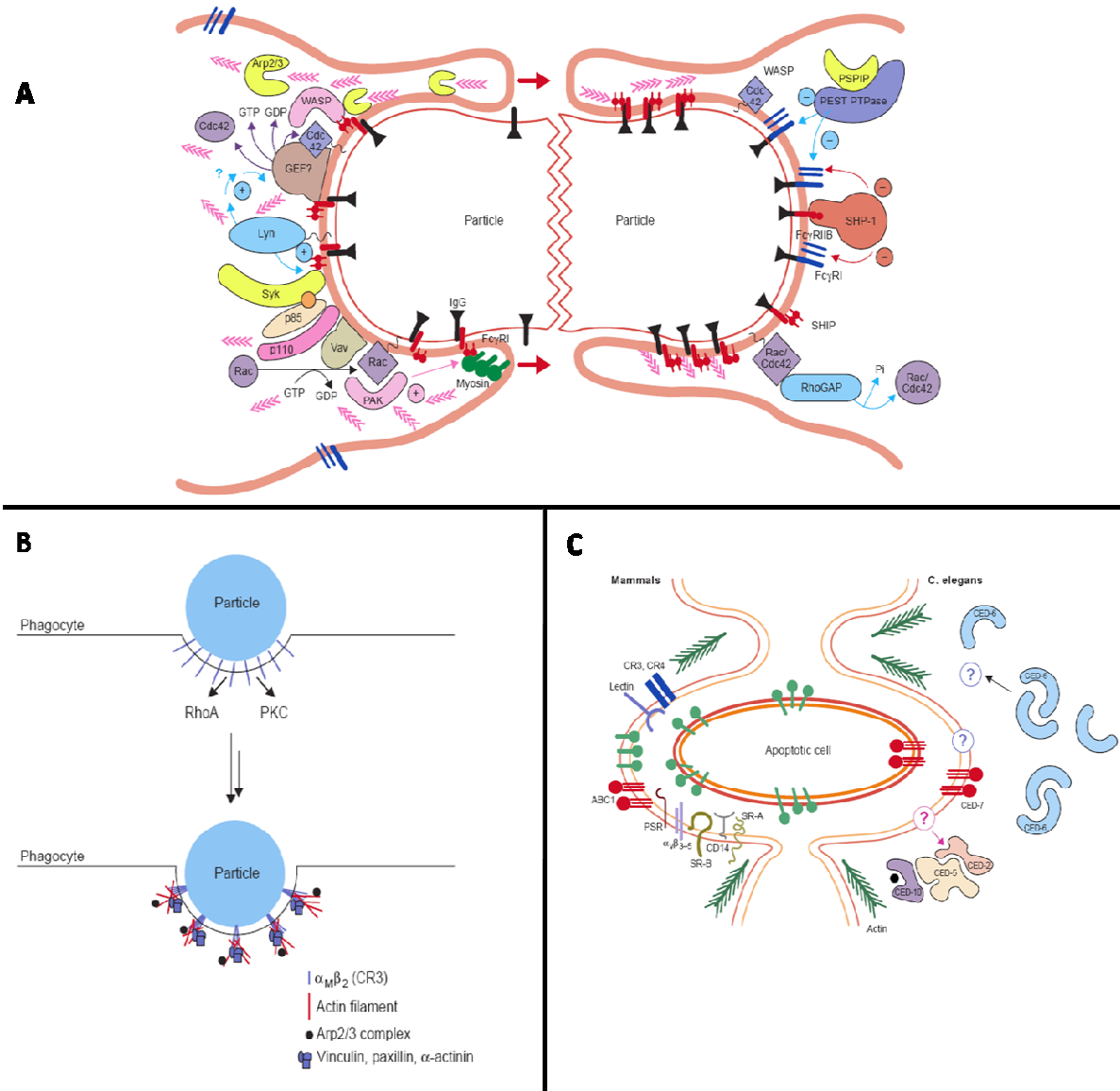


Figure 28 : Mécanismes de phagocytose. (A) Phagocytose médiée par les récepteurs Fc γ . (B) Phagocytose médiée par le récepteur C3. (C) Phagocytose des corps apoptotiques (D'après Chimini et al, 2000).

Ce sont les phénomènes de locomotion présentés dans la **Figure 29** qui permettent au macrophage d'entrer en contact avec le corps étranger à phagocyter. La polymérisation de l'actine entraîne la protrusion des pseudopodes et la création de points de contact focaux conduisant aux phénomènes de traction.

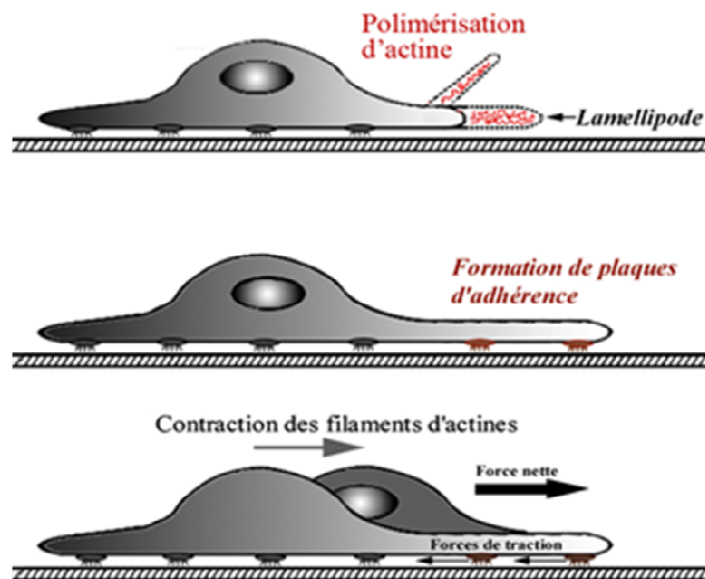


Figure 29 : Déplacement orienté d'une cellule sur un support : phénomène de locomotion (Adapté de archimede.ca).

A titre d'exemple, différentes équipes ont étudié l'étape de reconnaissance et d'**adhésion** (Beamer and Holian, 2005, Hamilton et al., 2006). Grâce à l'utilisation de modèles de souris transgéniques porteuses de délétions pour certains récepteurs de la phagocytose, il semble que le récepteur scavenger MARCO (MACrophage Receptor with Collagenous Structure) à la surface des macrophages soit en partie responsable de la phagocytose des particules de silice. Ce n'est pas le seul récepteur impliqué car une délétion totale de MARCO ne bloque pas complètement la phagocytose de ces particules, mais la diminue significativement. Ce récepteur joue toutefois un rôle important dans la phagocytose de silice par des macrophages. D'autres récepteurs tels que les récepteurs scavenger de type A, les récepteurs Fc et les récepteurs du complément pourraient aussi être impliqués pour des particules de nature différente (Andoh et al., 1991, Beamer and Holian, 2005, Kobzik, 1995).

Comme nous le verrons de façon plus détaillée dans la partie suivante, le cytosquelette est une structure dynamique et adaptable indispensable à l'étape d'**internalisation**. L'adhésion de la particule au macrophage entraîne une cascade signalétique régulée principalement par des processus de phosphorylations conduisant à une réorganisation du cytosquelette. Celle-ci implique notamment l'actine et en particulier les filaments d'actine-F (forme polymérisée). Cette réorganisation se fait grâce à de nombreuses protéines et enzymes surtout les Rho GTPases. Ceci permet la formation des pseudopodes qui vont entourer la particule en contact et conduire à son internalisation en formant un phagosome.

Pour l'étape de **digestion**, les lysosomes sont des composants particuliers des macrophages correspondant à des organites délimités par une enveloppe constituée d'une seule membrane qui contiennent de nombreuses enzymes de dégradation. Les lysosomes sont nombreux dans les macrophages, approximativement sphériques et ont habituellement un diamètre de 250-500 nm.

Véritable système digestif de la cellule, les lysosomes constituent une population d'organites intracellulaires possédant une activité enzymatique lytique et devant être entourés par une membrane. Il existe deux types principaux :

- Les lysosomes primaires, vésicules sphériques d'environ 0,5 μm de diamètre au contenu homogène.
- Les lysosomes secondaires, de taille variable et contenant le même équipement enzymatique que les précédents avec en plus, divers substrats en cours de dégradation.

Le caractère commun des lysosomes est de renfermer des enzymes lytiques dont une quarantaine sont décrites, appartenant toutes au groupe des hydrolases acides. Celles-ci peuvent être des protéases, des nucléases, des phosphatases, des lipases, des phospholipases, des glycosidases ou des sulfases et sont en quantité variable selon les types cellulaires. Le pH d'activité se situe aux alentours de 5, ce qui pose le problème de leur compartimentation dans la cellule.

La membrane des lysosomes, normalement imperméable à ces enzymes ainsi qu'aux ions, représente un système fermé à l'intérieur du cytoplasme et dans lequel le pH va diminuer, dévoilant ainsi l'activité enzymatique sans risque pour les autres composants cellulaires. L'acidité intralysosomiale augmente progressivement grâce à un système de transport actif utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP et qui pompe des ions H^+ à l'intérieur du lysosome.

Si les lysosomes primaires contiennent le matériel enzymatique nécessaire à leur fonction de digestion, leur transformation en lysosomes secondaires permet la mise en contact de ces enzymes lysosomiales avec différents types de substrats. Les lysosomes secondaires peuvent résulter de la fusion des lysosomes avec des vacuoles de phagocytose ou phagosomes, contenant de grosses particules telles que des bactéries. On les appelle des phagolysosomes, dans lesquels les particules ingérées seront lysées. Les lysosomes primaires peuvent aussi fusionner avec des vésicules d'endocytose avec récepteurs ou des vésicules de pinocytose. Les lysosomes secondaires prennent alors un aspect classique à contenu hétérogène, ou alors celui de corps multivésiculaires, c'est-à-dire de larges vacuoles digestives renfermant les vésicules d'endocytose.

La digestion des substrats dans les lysosomes secondaires se fait de façon très économique : les molécules de faible poids moléculaire qui en résultent traversent la membrane lysosomiale et seront réutilisées par la cellule. Si certaines molécules ne sont pas métabolisables, elles persistent dans les lysosomes sous forme de corps résiduels. Ceux-ci seront alors expulsés dans le milieu extracellulaire par exocytose.

Par leur capacité de dégradation, les lysosomes permettent aux cellules d'assurer des fonctions précises, à la fois pour elles-mêmes et pour l'organisme entier. Ils jouent un rôle dans le renouvellement des constituants cellulaires, le métabolisme de certaines molécules ingérées par endocytose, la régulation de la sécrétion glandulaire, la défense de l'organisme principalement grâce aux macrophages, ou encore l'involution définitive ou temporaire de certains organes comme le thymus ou la glande mammaire et les phénomènes de vieillissement.

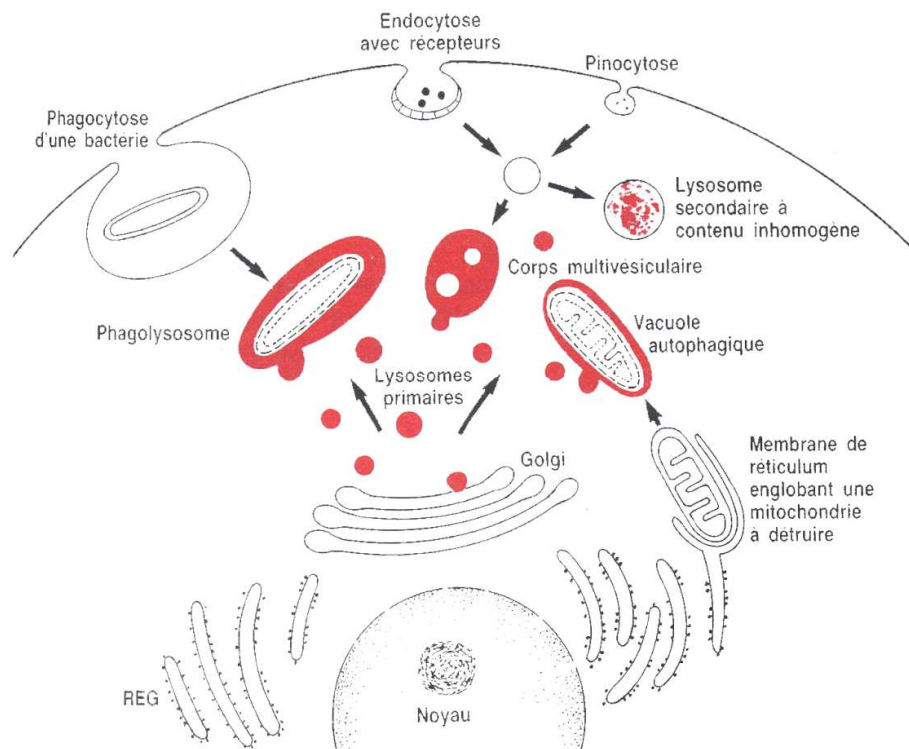


Figure 30 : Schéma récapitulatif des activités lytiques des lysosomes (Histologie, Jean Pierre DADOUNE, Médecine-Sciences Flammarion).

Concernant l'étape de **digestion**, l'équipe de Thibodeau *et al.* (Thibodeau et al., 2004) a travaillé sur l'activité enzymatique lysosomale dans des macrophages de souris au cours de l'apoptose induite par la silice. Il était déjà établi que l'exposition de macrophages à la silice causait une dépolarisation mitochondriale et une activation des caspases-3 et -9 conduisant à l'apoptose. Les auteurs ont montré que la fragmentation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et l'activation de ces deux caspases diminuent avec l'utilisation d'inhibiteur de la cathepsine-D lysosomale (protéase tenant une place importante dans la dégradation des protéines par le lysosome), et de l'acide sphingomyélinase lysosomale (enzyme phosphodiesterase qui agit sur la sphingomyéline que l'on trouve dans les membranes cellulaires). Ces deux molécules auraient donc un rôle certain dans les voies de signalisation apoptotique induites par la silice.

L'équipe de Steinberg *et al.* a étudié l'acidification du phagosome et montré qu'une fois formé, le phagosome entre dans un processus de maturation avec de nombreux réarrangements et une acidification du compartiment (Steinberg et al., 2007).

Certains lipides comme les sphingolipides, le cholestérol, et les glycérophospholipides, semblent intervenir au cours du processus de phagocytose, notamment dans la formation des phagosomes (Yeung and Grinstein, 2007).

Les phagosomes ont été étudiés grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques marquant des compartiments intracellulaires définis (Bassoe et al., 2003). D'après la littérature, la sonde LysoTracker®red permet le marquage des vésicules acides, surtout les lysosomes. Les analyses sont réalisées en cytométrie en flux (CMF) et en microscopie confocale. Cette technique pourrait s'avérer également intéressante pour notre étude, car avec une telle approche expérimentale il est envisageable de développer une analyse quantitative de la co-localisation nanoparticules/lysosomes aussi bien en CMF qu'en microscopie confocale.

Enfin, concernant l'étape de **rejet**, en général, les éléments ayant été digérés sont rejetés vers l'extérieur de la cellule par un phénomène d'exocytose. Or dans le cas de certaines particules, il semble que celles-ci ne peuvent pas être dégradées par la cellule et s'accumulent dans le cytoplasme comme le goudron de cigarettes ou les fibres d'amiante par exemple (**Lippmann et al., 1980**). L'hypothèse la plus probable pour l'élimination de ces corps étrangers passe par l'appareil muco-ciliaire qui permettrait l'expectoration de ces macrophages ou bien leur passage dans l'appareil digestif (**Akiyama et al., 2003, Geiser, 2010**).

II.2.2.3.1 Quantification du processus de phagocytose

Les macrophages présents *in vivo* au sein de l'appareil respiratoire humain et plus précisément dans les alvéoles pulmonaires, participent à la barrière défensive de l'organisme. En effet, ces cellules présentent une activité de phagocytose qui leur permet d'éliminer les particules étrangères atteignant les alvéoles. D'anciennes études font déjà état de ce mécanisme et des différentes façons de quantifier ce phénomène notamment grâce à l'utilisation de particules fluorescentes et de techniques de CMF ou de microscopie classique (**Van Amersfoort and Van Strijp, 1994, Stewart et al., 1986, Hed, 1986**). Il est aussi possible de mesurer ce processus de manière plus indirecte en quantifiant des molécules ou des substances relarguées au cours de la phagocytose comme le stress oxydant, de façon plus générale des molécules de la réponse immunitaire (opsonines, facteurs du complément, etc.) ou la capacité de destruction bactérienne (**Verhoef and Waldvogel, 1985, Karnovsky and Badwey, 1986, Absolom, 1986**).

L'équipe de Balduzzi *et al.* a réalisé une étude intéressante de quantification indirecte de la phagocytose (**Balduzzi et al., 2004**). Les auteurs ont mis en contact des macrophages avec des particules de silice à différentes concentrations pendant 24 heures, puis ont évalué le potentiel de phagocytose en incubant les cultures avec des billes de latex fluorescentes de 2 µm de diamètre. Ils ont alors quantifié la fluorescence par CMF. Ils ont observé qu'un traitement à la silice limite les fonctions de phagocytose des macrophages. Cependant dans cette étude ce ne sont pas les particules d'intérêt qui sont directement analysées car celles-ci ne sont pas fluorescentes. Il s'agit donc d'une évaluation indirecte de la phagocytose des particules en remplaçant les particules d'intérêt par des billes fluorescentes de taille équivalente. Cependant ces billes ne présentent pas les mêmes caractéristiques de surface que les particules d'intérêt, et il est tout à fait possible que le processus de phagocytose ainsi observé soit de nature et d'intensité différente.

Peu d'études quantifient efficacement le nombre de particules internalisées par les macrophages alors que ce paramètre apparaît très important au regard des données biologiques de toxicité.

Certaines équipes travaillent avec des nanoparticules fluorescentes et quantifient la fluorescence grâce à des techniques de fluorimétrie mais ne tiennent pas compte de la proportion de nanoparticules réellement internalisées par rapport aux nanoparticules simplement adhérentes à la surface des cellules (**Hu et al., 2007, Sant et al., 2008, Yan et al., 2010**). De même, plusieurs équipes utilisent la CMF et le paramètre de side scatter pour quantifier une population de cellules phagocytantes. Mais cette méthode est incomplète et ne permet pas de distinction précise de la localisation des nanoparticules au niveau cellulaire. En effet ce paramètre donne une information

sur la complexité cellulaire globale sans tenir compte des particules adhérentes au niveau de la membrane plasmique (**Goldsmith et al., 1997**). Il en est de même dans la publication suivante (**Habertz et al., 2007**), où l'évaluation de la phagocytose par CMF, se fait grâce à la mesure du Right Angle Scatter (RAS) qui est corrélée avec la granulométrie de la cellule analysée. C'est un paramètre pertinent pour mesurer l'interaction entre les macrophages et les particules, mais ce n'est pas suffisant pour une quantification précise du nombre de particules ingérées par la cellule.

Seules certaines équipes distinguent les nanoparticules adhérentes des nanoparticules internalisées. Le quenching au bleu trypan est utilisé lorsque les nanoparticules sont fluorescentes (**Clift et al., 2008, Gratton et al., 2008**), sinon d'autres mécanismes tels que l'élimination physique ou chimique des nanoparticules adhérentes sont réalisées (**Cho et al., 2009**).

D'autres méthodologies de quantification sont basées sur une propriété particulière des nanoparticules utilisées comme par exemple la radioactivité (**Su et al., 2010**).

Enfin certaines équipes ne quantifient pas du tout l'internalisation mais réalisent des observations microscopiques, grâce à des techniques telles que la microscopie électronique à transmission (MET) ou la microscopie confocale, pour pouvoir affirmer que les nanoparticules sont bien internalisées (**Song et al., 2010**). Malgré le manque de données quantitatives il est cependant plus facile de déterminer le mécanisme prépondérant d'internalisation impliqué grâce à la MET.

Au vue de ces données de la littérature, une approche multiparamétrique semble essentielle pour aborder la question de l'internalisation des nanoparticules dans les cellules.

II.2.3 Le cytosquelette : structure d'interaction avec le milieu environnant

Le cytosquelette est une organisation spatiale dynamique, responsable de la forme d'une cellule et de ses propriétés d'adhérence et de mobilité. Il assure aussi de nombreuses autres fonctions, en association avec différentes protéines, comme le maintien de la structure interne, et en particulier des compartiments cellulaires, le mouvement des composants de place en place au sein de la cellule (tri et adressage des protéines intracytoplasmiques par exemple), la division cellulaire, l'ancrage aux membranes des cellules voisines, la formation de protrusions ou d'involutions membranaires (importantes pour la phagocytose et pour la migration cellulaire : pseudopodes) et la contraction des cellules musculaires. Le cytosquelette joue un rôle majeur dans les phénomènes d'internalisation.

Il comprend trois composants organisés en réseaux de filaments cytoplasmiques : les **microtubules** (regroupés autour d'un centre organisateur), les **microfilaments d'actine** (ubiquitaires) et les **filaments intermédiaires** (**Figure 31**). Les trois systèmes de filaments sont extrêmement dynamiques et modifient leur organisation en réponse aux besoins de la cellule. Ces structures sont des polymères en forme de fils, constitués de milliers de molécules protéiques identiques. Sur le plan fonctionnel, ces polymères sont associés à de nombreuses autres protéines accessoires. Nous nous proposons dans cette partie de détailler les constituants du cytosquelette et

leurs modes de régulation en insistant tout particulièrement sur les filaments d'actine impliqués dans le processus de phagocytose.

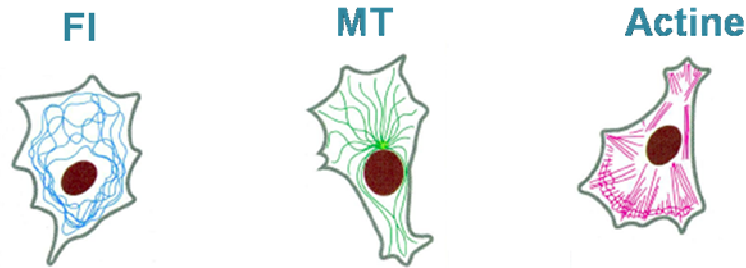


Figure 31 : Les trois principaux constituants du cytosquelette : filaments intermédiaires (FI), microtubules (MT) et microfilaments d'actin (Adapté de humans.be).

II.2.3.1 Filaments intermédiaires et microtubules

Les filaments intermédiaires sont des molécules fibrillaires stables d'un diamètre de 8 à 10 nm (intermédiaire entre celui de l'actine et celui des microtubules). Ils se disposent autour du noyau, qu'ils entourent à la manière d'une corbeille, et s'étendent jusqu'à la périphérie cellulaire, sous la membrane plasmique. Parmi les systèmes de filaments cytoplasmiques, ce sont les plus stables. Ils s'insèrent sur des protéines intra-membranaires par l'intermédiaire de protéines extrinsèques cytoplasmiques. Ils concourent largement au maintien de la forme cellulaire et à l'ancrage des organites cellulaires. Ils jouent un rôle mécanique en renforçant la solidité cellulaire. Ils interviennent aussi dans l'adhérence et la cohésion cellulaire car ils sont en relation avec les desmosomes et les hémidesmosomes (jonctions cellulaires).

Les filaments intermédiaires de divers tissus de mammifères se ressemblent beaucoup mais sont en fait constitués de monomères de protéines différentes, on parle de neurofilaments dans les cellules nerveuses, de filaments de desmine dans les cellules musculaires, de filaments de vimentine dans les fibroblastes et de filaments constitués de kératine dans les cellules épithéliales.

Ces diverses protéines peuvent générer une structure commune parce que toutes partagent la même structure de base. Cette dernière est constituée d'une partie centrale α -hélicoïdale ainsi que de deux extrémités carboxy- et amino-terminales non-hélicoïdales. La plupart des variations entre les protéines des filaments intermédiaires se situent dans ces extrémités qui confèrent probablement des propriétés légèrement différentes aux différentes classes de filaments intermédiaires.

Les microtubules sont de longs polymères constitués d'hétérodimères de tubuline $\alpha\beta$, qui possèdent une extrémité plus distale (proche de la membrane cellulaire) et une extrémité moins proche du noyau. Ils ont la forme de tubes creux de 25 nm de diamètre dont l'assemblage (polymérisation) et le désassemblage (dépolymérisation) à partir d'un pool de monomères (les molécules de tubuline) dépendent de l'hydrolyse de GTP (guanosine triphosphate). Les microtubules se disposent radialement autour du centre organisateur des microtubules aussi appelé centrosome (Eng et al., 2007).

A leur extrémité plus (+) la croissance peut s'effectuer rapidement A l'extrémité moins (-) des sous-unités de tubuline $\alpha\beta$ sont perdues si elles ne sont pas stabilisées. Lors de la croissance, des molécules de tubuline sont ajoutées à l'extrémité libre. Après polymérisation et croissance survient une hydrolyse de la GTP (Guanosine Triphosphate) qui affaiblit les liaisons des sous-unités, ce qui, finalement, conduit à une dépolymérisation. Mais l'extrémité libre peut être stabilisée par des protéines couvrantes. Les microtubules ne sont pas des structures permanentes, leur demi-vie est d'environ dix minutes. Ces microtubules sont dits labiles et sont caractérisés par leur instabilité dynamique. L'instabilité dynamique se définit par le comportement des microtubules qui subissent, en permanence et très rapidement, des phases de polymérisation et de dépolymérisation. Ces microtubules labiles sont opposés aux microtubules dits stables qui s'intègrent dans des structures complexes comme les centrioles et l'axonème des cils et des flagelles.

Les MAPs (microtubule-associated proteins, protéines associées au microtubule) sont des protéines interagissant avec les microtubules (**Lamprou et al., 2005**). Les MAPs qui regroupent les MAPs structurales et les MAPs motrices, sont des protéines s'associant avec les tubulines α et β .

Les MAPs structurales constituent, avec les tubulines, des associations spécifiques très fortes qui stabilisent les MT et organisent leur assemblage.

Les MAPs motrices interviennent dans le déplacement d'organites (kinésine et dynéine). La kinésine assure des transports en direction du pôle positif (mouvement antérograde), d'organites ou de grains de sécrétion. La dynéine est responsable des mouvements rétrogrades (en direction du pôle négatif). Leur sens est spécifié par la polarité des microtubules. Kinésine et dynéine sont des ATPases qui utilisent l'énergie de l'ATP (adénosine triphosphate). Ces protéines ont des structures très voisines, ce sont des complexes composés de deux chaînes lourdes identiques et de plusieurs chaînes légères. Chaque chaîne lourde possède une région comportant une ou plusieurs têtes globulaires, qui attachent la protéine au microtubule. L'extrémité globulaire de la kinésine ou de la dynéine se fixe sur les molécules de tubuline β . La kinésine et la dynéine se déplacent par saut d'une sous-unité β à la suivante. Les deux chaînes légères se lient aux organites ou à la membrane des vésicules (**Figure 32**).

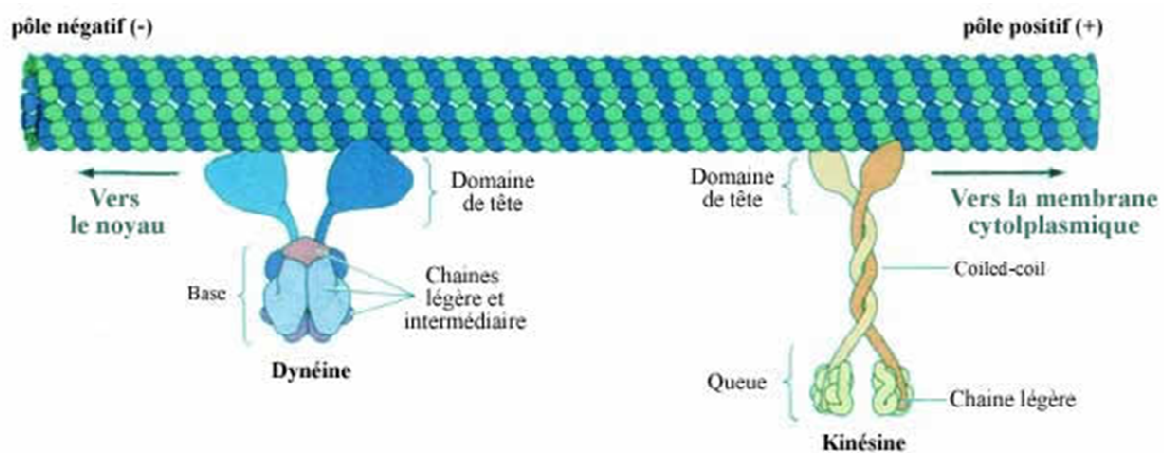


Figure 32 : Moteurs moléculaires et cytosquelette (facbio.com).

Ces protéines motrices sont le fondement de l'organisation spatiale des organites et de leur déplacement correct dans la cellule.

Il existe aussi des protéines non MAPs associées aux microtubules mais elles ne sont actuellement pas toujours bien définies. Elles seraient impliquées dans la transduction de signaux et s'associeraient temporairement aux microtubules. Par exemple la neurofibromine, des sous-unités α de plusieurs protéines G, la géphyrine, certaines kinases et enfin la dynamine (une GTPase qui intervient dans l'endocytose et possède des sites de fixation microtubulaire) (**Orth and McNiven, 2003**, **Ochoa et al., 2000**).

De nombreuses fonctions sont attribuées aux microtubules comme le déplacement des chromosomes, le maintien de la polarité cellulaire ou l'intégrité de l'appareil de Golgi. Seules certaines fonctions vont nous intéresser plus précisément comme le transport des vésicules d'endocytose, leur rôle dans l'excrétion et le maintien de la structure de la membrane plasmique. Concernant le transport des vésicules d'endocytose, les vacuoles de pinocytose ou les phagosomes, immédiatement après leur individualisation, se lient aux microtubules par l'intermédiaire de CLIP170, une protéine cytoplasmique de liaison qui associe les vésicules aux microtubules. Les dynéines reliaient ensuite CLIP170 et assureront le transport en direction de l'extrémité négative. Les éléments transportés s'accumulent ainsi dans des régions voisines de l'appareil de Golgi et des lysosomes (**Binker et al., 2007**). Concernant enfin le maintien de la structure de la membrane plasmique, la phagocytose se caractérise par la pénétration d'une partie de la membrane plasmique dans le cytoplasme (**Linder et al., 2000**). La membrane contient des sites spécifiques de transport des acides aminés. Dans les conditions normales, au cours de la phagocytose, ces sites sont respectés et restent tous dans la membrane plasmique, de telle sorte que la membrane du phagosome n'en contient pas. Cette répartition des sites dépendrait des microtubules.

II.2.3.2 Microfilaments d'actine

II.2.3.2.1 Généralités

Les microfilaments d'actine, d'un diamètre compris entre 6 et 8 nm, sont des polymères de l'actine ubiquitaires dans les cellules eucaryotes. Trois classes d'actine sont actuellement connues. L'actine α est présente essentiellement dans les fibres musculaires striées et dans les cellules musculaires lisses, l'actine β et l'actine γ dans les cellules non musculaires. L'actine existe dans toutes les cellules sous deux formes : la forme globulaire ou actine G et la forme fibrillaire ou actine F. La forme G est la forme de stockage. Elle possède une structure en forme bivalve (deux domaines à concavité interne) pouvant s'ouvrir pour fixer l'ATP dans un site de liaison. L'actine F provient de la polymérisation de l'actine G et elle a la forme d'un filament d'un diamètre moyen de 7 nm (**Figure 33**). De plus, les microfilaments d'actine sont polarisés, avec une extrémité plus (+) à croissance rapide (polymérisation) et une extrémité moins (-) à croissance lente qui correspond plutôt à un site de dépolymérisation.

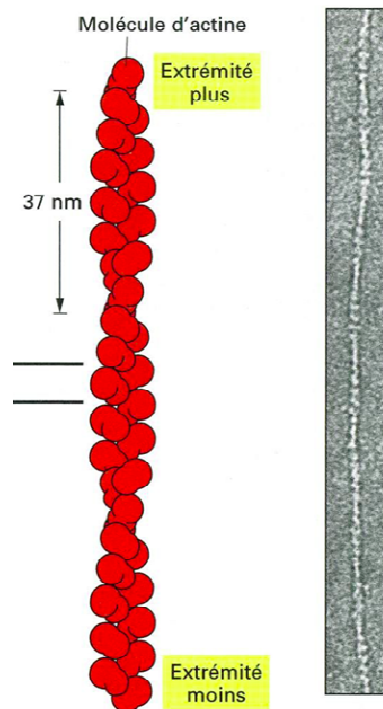


Figure 33 : Présentation d'un microfilament d'actine (humans.be).

La polymérisation de l'actine dépend de la présence et de la concentration de Mg^{++} , de K^+ , d'ATP et d'actine G. De plus, diverses protéines de liaison à l'actine déterminent la nucléation et la polymérisation et, par voie de conséquence, la position et la longueur des microfilaments d'actine. Ainsi, la protéine WASp (Wiskott-Aldrich syndrome) intervient dans la polymérisation et l'organisation des microfilaments d'actine (**Tsuboi and Meerloo, 2007**). Une autre famille de protéines est associée à l'actine et joue un rôle dans la constitution des filaments et lors de leur liaison entre eux ou avec d'autres molécules, ce sont les protéines de liaison ou ABP (actin binding protein ; protéines de liaison de l'actine) qui, en s'associant aux microfilaments d'actine, interviennent dans leur polymérisation et leur dépolymérisation, leur stabilisation, leur organisation en faisceaux, leur organisation en réseaux, leur fragmentation, leur fixation sur la face interne de la membrane plasmique, leur destruction ou leur fragmentation, etc.

II.2.3.2.2 Organisation des microfilaments d'actine et contacts focaux

L'actine G passe par des alternances de polymérisation et de dépolymérisation, l'actine F par des états de réticulation et de déréticulation, des états fasciculés et défasciculés. Ainsi il existe trois principaux types d'organisation des microfilaments d'actine dans les cellules (**Figure 34**).

Organisation

- En faisceau parallèle ou anti-parallèle
- En réseau

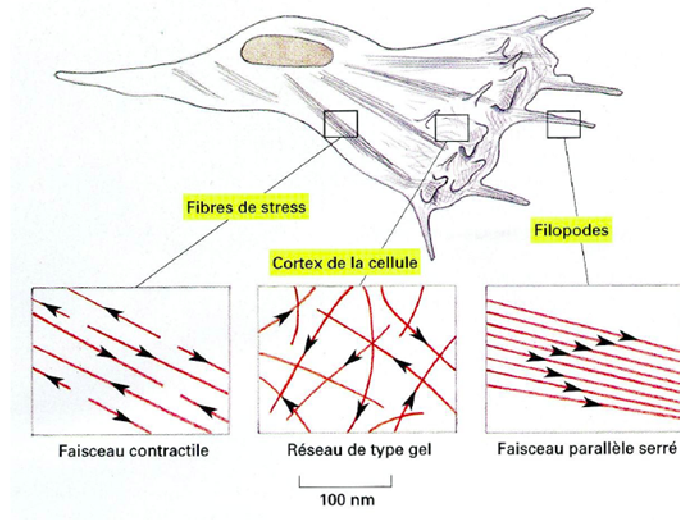


Figure 34 : Organisation des microfilaments d'actine au niveau cellulaire.

Les faisceaux contractiles (ou fibres de stress), sont associés à des molécules de myosine II. Ils peuvent soit s'insérer sur la membrane plasmique au niveau de points de contacts focaux, soit constituer des anneaux contractiles, soit être associés à des jonctions. L'activation de la petite protéine G Rho provoque la formation des fibres de tension.

Les faisceaux serrés sont des structures constituées par des microfilaments d'actine parallèles orientés avec la même polarité. Ils ne sont pas contractiles et s'observent en particulier dans les filopodes ou les lamellipodes (expansions filiformes intervenant dans les mouvements de déplacement). La nucléation des microfilaments d'actine est à l'origine de la protrusion de la membrane plasmique.

Enfin, les microfilaments d'actine contrôlent la viscosité du cytoplasme en s'organisant en réseaux. Ainsi la réticulation des microfilaments d'actine par la filamine fige le cytoplasme et le transforme en une substance semi-solide, un gel. La fragmentation des microfilaments d'actine par la gelsoline joue un rôle fondamental dans l'exocytose (**Lanzetti, 2007**). En effet, les microfilaments d'actine réalisent un véritable feutrage sous-membranaire qui s'oppose au passage des grains de sécrétion. Il est nécessaire que les microfilaments d'actine soient localement détruits pour permettre aux grains de sécrétion de gagner la membrane plasmique. Le déplacement des grains de sécrétion en direction de la membrane plasmique dépend de la myosine I et des microfilaments d'actine.

Un autre phénomène tout à fait intéressant concernant le cytosquelette porte sur la formation de points de contact focaux en périphérie des cellules comme par exemple au niveau des podosomes qui sont des structures spécifiques des macrophages, des ostéoclastes et de certaines cellules tumorales (**Adams, 2002**). Les points de contact focaux (plaques d'adhésion, plaques d'adhérence) sont des zones d'adhérence de la membrane plasmique au substrat. Ils contiennent des SAM (Substrate Adhesion Molecule, molécule d'adhésion au substrat) comme les intégrines. Les intégrines constituent une famille de glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires, capables de se lier et de reconnaître de nombreux composants de la matrice extracellulaire. Les molécules

d'intégrines (récepteur d'adhésion) s'attachent par leur extrémité extracellulaire à un de leur ligand, la fibronectine synthétisée par la cellule. On trouve dans ces points de contact focaux différentes molécules comme la vinculine (**Ziegler et al., 2006**) faisant le lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine et la taline qui co-localise avec les intégrines. La taline peut être clivée par la calpaïne qui est une enzyme importante dans la dynamique des points focaux.

Les podosomes sont des structures complexes comme le montre la **Figure 35**. La paxilline, l' α -actinine, la gelsoline et la dynamine entrent aussi dans la composition des podosomes. Ils sont visualisables par microscopie à fluorescence ou confocale et sont donc quantifiables en appliquant une analyse adéquate basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes.

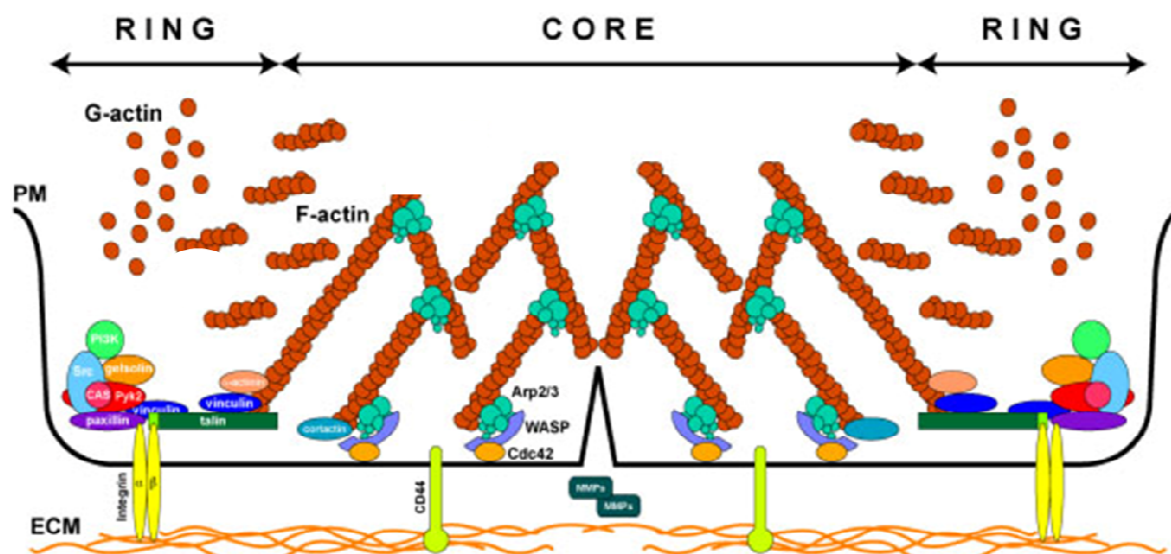


Figure 35 : Schéma détaillant la structure des podosomes. Une organisation particulière des différents types de protéines (intégrines, vinculine, paxilline, taline, α -actinine et filaments d'actine) existe à la périphérie et au centre du podosome (Actin dynamics SPP 1464).

Cdc42 est un gène important qui code pour de petites GTPases de la sous famille Rho/Rac impliquées dans la régulation du cytosquelette. Les protéines Rho sont impliquées dans la réorganisation et l'assemblage des contacts focaux et la réorganisation des filaments d'actine. Les interactions membrane/actine, au niveau des contacts focaux, interviennent dans l'ancrage des cellules au substrat, la régulation de la locomotion cellulaire, le contrôle de la forme cellulaire, la stabilisation des attachements à d'autres cellules et les réponses cytoplasmiques aux facteurs de croissance et aux autres stimuli (**Geiger and Bershadsky, 2001, Hall, 2005, Hotchin and Hall, 1995**).

D'autres publications soulignent l'implication des Rho GTPases dans la réorganisation du cytosquelette (**Chimini and Chavrier, 2000, Castellano et al., 2001, Niedergang and Chavrier, 2005**) ainsi que le rôle de certaines protéines comme ARF-6 (**Gillingham and Munro, 2007**). ARF-6 (ADP-ribosylation factor 6), localisée dans la membrane plasmique, est impliquée dans de nombreux processus incluant l'endocytose et l'organisation du cytosquelette d'actine. Son mode d'action impliquerait l'augmentation de la synthèse du phosphatidylinositol 4,5 - biphosphate et la régulation de protéines G de la famille Rho. Une étude où des mutants dominants négatifs pour ARF-6 ont été utilisés montre par microscopie électronique qu'ARF-6 serait un régulateur majeur dans le recyclage des membranes au cours de la phagocytose (**Niedergang et al., 2003**).

Enfin, il a été observé que certaines particules (dioxyde de titane, carbone, particules diesel et poussières urbaines) entraînaient des dysfonctionnements du cytosquelette impliqués dans la phagocytose et dans les mécanismes de transport. Ceci a été notamment montré par l'équipe de Möller *et al.* grâce à des études en CMF et en cytomagnétométrie où a été observé une augmentation de la rigidité du cytosquelette et une déficience au niveau du transport des phagosomes (Moller et al., 2002, Moller et al., 2005).

II.2.3.2.3 Toxines influant sur les filaments du cytosquelette

Le dernier point concernant les données sur le cytosquelette concerne les toxines interagissant avec les microfilaments d'actine et que nous utiliserons comme inhibiteurs de la phagocytose dans une partie de nos travaux.

En effet, la survie des cellules eucaryotes dépend de l'équilibre entre l'assemblage et le désassemblage des filaments hautement conservés du cytosquelette. Les microfilaments d'actine du cytosquelette de certaines cellules entrent en jeu dans les processus d'internalisation et plus précisément de phagocytose comme nous l'avons précédemment évoqué (Niedergang and Chavrier, 2005, Jones, 2000). La publication de l'équipe de Habertzettl *et al.* montre l'implication de l'actine dans la phagocytose induite par des particules de quartz sur une lignée de macrophages. Les auteurs réalisent une étude du recrutement du cytosquelette lors de l'incorporation de particules visualisée par CMF et microscopie à fluorescence. L'auteur montre que l'inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine-D implique une diminution de l'incorporation des particules. Le quartz, connu pour augmenter la production d'espèces oxygénées réactives (ROS pour Reactive Oxygen Species en anglais) et la génération de TNF- α (tumor necrosis factor alpha) voit sa phagocytose bloquée quand la polymérisation de l'actine est inhibée. Il y a donc une forte implication du cytosquelette dans l'incorporation des particules de quartz au cours de la phagocytose (Habertzettl et al., 2007).

L'actine et la tubuline sont des cibles pour des toxines naturelles à action ciblée sur ces divers types de filaments et sont résumées dans le **Tableau 4**. Certaines de ces toxines sont employées notamment dans les traitements de chimiothérapie.

SUBSTANCES CHIMIQUES SPECIFIQUES DE L'ACTINE	
Phalloïdine	Se fixe sur les filaments et les stabilise
Cytochalasine	Coiffe les extrémités plus des filaments
Swinholide	Sectionne les filaments
Latrunculine	Se fixe sur les sous-unités et empêche leur polymérisation
SUBSTANCES CHIMIQUES SPECIFIQUES DES MICROTUBULES	
Taxol	Se fixe sur les microtubules et les stabilisent
Colchicine, colcémide	Se fixe sur les sous-unités et empêche leur polymérisation
Vinblastine, vincristine	Se fixe sur les sous-unités et empêche leur polymérisation
Nocodazole	Se fixe sur les sous-unités et empêche leur polymérisation

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des principales toxines ciblant le cytosquelette.

Ainsi, dans notre étude, la phagocytose a été bloquée en ajoutant ces molécules spécifiques aux cultures de cellules avant l'introduction des particules. Ces molécules sont des inhibiteurs des filaments d'actine impliqués dans les réarrangements du cytosquelette nécessaires à la phase d'initiation du processus de phagocytose et font partie du tableau précédent. La première molécule testée a été la Cytochalasine-D (Cyt-D) (**Haberzettl et al., 2007, Kanno et al., 2007, Moller et al., 2002**). Cette toxine bloque la polymérisation des filaments d'actine du cytosquelette qui sont recrutés lors des phases initiales du processus de phagocytose. Une seconde molécule présentant exactement le même mode d'action que la Cyt-D a ensuite été testée. Il s'agissait de la Latrunculine-A (Lat) (**de Oliveira and Mantovani, 1988, Oliveira et al., 1997, Oliveira et al., 1996, DeFife et al., 1999**). Enfin, une troisième molécule ayant un mode d'action différent par rapport à la Cyt-D a aussi été testée. Il s'agissait de la Jasplakinolide (Jasp) qui bloque l'actine sous sa forme polymérisée (**Odaka et al., 2000, Powers et al., 2006**). D'un point de vue comparatif, les cellules ont aussi été traitées au paraformaldéhyde (PFA) (**Vanderslice and Collins, 1991, Moon et al., 2007**). Cette fixation des cellules au PFA permet d'obtenir des cellules mortes incapables de phagocyter les particules et ce type de traitement a constitué notre référence absolue afin de comparer l'efficacité des inhibiteurs du cytosquelette d'actine.

III. Impact des paramètres physico-chimiques sur l'activité biologique

Le risque toxique résulte d'une part de la toxicité intrinsèque d'un produit et d'autre part du niveau d'exposition des personnes. Or la toxicité intrinsèque des nanoparticules dépend de leurs paramètres physico-chimiques tels que la nature chimique, la solubilité, les propriétés physiques, la dimension, la forme, la structure, etc.

Nous verrons donc dans un premier temps l'impact de ces paramètres avant de développer la notion de nanotoxicologie.

III.1 Influence des paramètres physico-chimiques

Dans le cas des nanoparticules il est nécessaire de prendre en compte certains paramètres spécifiques non évalués dans les tests de toxicité classiques. Ces paramètres sont principalement des paramètres physicochimiques. Ils sont résumés dans le **Tableau 5** puis exposés plus en détail avec quelques exemples concrets.

Morphologie	Taille
	Surface spécifique
	Distribution en taille
	Forme
	Porosité
	Agrégation
Composition chimique	Elément chimique
	Pureté
	Structure cristalline
	Propriétés électroniques
Surface	Fonctions chimiques de surface
	Recouvrement inorganique ou organique
	Potentiel surfacique
Stabilité physico-chimique	Solubilité
	Acidité/Basicité

Tableau 5 : Principaux paramètres physico-chimiques des nanoparticules pouvant avoir une influence sur l'activité biologique (Adapté de Zeyons, 2008).

Le dépôt des nanoparticules inhalées dans chacune des trois régions du tractus respiratoire (les voies aériennes supérieures, l'arbre trachéobronchique et la région alvéolaire), dépendrait largement de leur diamètre aérodynamique, ce qui pourrait avoir des conséquences sur leurs effets

potentiels. La taille de la nanoparticule est également intrinsèquement liée à sa surface spécifique, au moins dans le cas des nanomatériaux solides. La taille aurait donc un impact très important sur la biodistribution des nanoparticules. Il est cependant important de faire attention à la dénomination utilisée pour la taille des nanoparticules, en effet nous différencierons la taille native de la taille agglomérée, le diamètre aérodynamique et le diamètre hydrodynamique.

Le diamètre aérodynamique correspond au diamètre d'une particule sphérique de densité égale à 1 g/cm³ ayant la même vitesse de dépôt que la particule mesurée. Le diamètre aérodynamique permet de quantifier la dimension d'une particule aérienne. Le diamètre hydrodynamique comprend à la fois la taille de la particule mais aussi l'épaisseur de la couche de solvation et correspond au diamètre d'une sphère théorique qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule considérée. La taille géométrique d'une nanoparticule peut être mesurée en MET, le diamètre hydrodynamique est évalué en grâce à la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS – Dynamic Light Scattering) et le diamètre aérodynamique avec un impacteur en cascade (ELPI – Electrical Low Pressure Impactor).

La taille des nanoparticules serait aussi un paramètre déterminant au regard des phénomènes d'internalisation intracellulaire (**Chithrani et al., 2006, Clift et al., 2008, He et al., 2010**). Nous reviendrons plus en détail sur cet aspect dans la suite du manuscrit.

Les nanoparticules manufacturées peuvent avoir des formes très diverses (par exemple : sphériques, fibreuses, tubulaires, circulaires et planes). La forme ou morphologie des nanoparticules semble conditionner leurs effets biologiques (**Arnida et al., 2011**). Il a été montré dans des études toxicologiques expérimentales *in vitro* et *in vivo* sur des particules de taille micrométrique et de formes variées, que les particules fibreuses naturelles, comme l'amiante, ou manufacturées, comme les fibres vitreuses, sont associées à des effets cytotoxiques et génotoxiques accrus et à un risque augmenté de survenue de fibroses pulmonaires et de cancers bronchopulmonaires. Les fibres ont une biopersistance plus longue que les particules sphériques. La biopersistance est une caractéristique importante, car plus les formes fibreuses restent longtemps au contact des cellules, plus leurs effets biologiques peuvent être importants et délétères (**Stanton et al., 1977**). Dans une étude de Watanabe et al., des macrophages alvéolaires de rat ont été exposés à des concentrations similaires de particules dioxyde de titane (TiO₂) fibreuses et sphériques (1-2 µm) (**Watanabe et al., 2002**). Les résultats obtenus en microscopie électronique montrent des changements vacuolaires et des dommages des surfaces cellulaires des macrophages exposés aux particules fibreuses de TiO₂ (700 nm). En revanche, aucun changement significatif n'a été observé pour les macrophages exposés aux particules sphériques. Un relargage plus important de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture, indicateur d'altération de la membrane plasmique donc indirectement de cytotoxicité, a été mesuré après exposition aux particules fibreuses. Les résultats de ces expériences suggèrent que la cytotoxicité du TiO₂ dépend clairement de la forme du matériel. Les paramètres critiques sont donc la dose, la taille et la biopersistance des fibres. La forme des nanoparticules semble donc jouer un rôle dans leurs effets biologiques. Ceci est confirmé par une autre étude montrant que l'efficacité de l'internalisation au niveau cellulaire apparaît fortement dépendante de la forme, de la taille et du nombre de particules (**Gratton et al., 2008**).

La petite taille et la grande surface spécifique des nanomatériaux solides leur confèrent des propriétés particulières, comme par exemple, des effets catalytiques de réactions chimiques.

L'importance de la surface devient évidente, lorsque la surface des atomes ou des molécules est prise en considération, jouant un rôle essentiel dans la détermination des propriétés physicochimiques des nanomatériaux (Nel et al., 2006). Le ratio surface/nombre total d'atomes ou de molécules augmente de façon exponentielle avec la diminution de la taille de la particule. Comme les réactions chimiques surviennent à la surface, ceci signifie que les nanomatériaux pourraient être plus réactifs que ces mêmes matériaux composés de particules de plus grande taille. Par exemple, dans un volume inhalé comportant une concentration de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ d'air, le nombre de particules de $5 \mu\text{m}$ est de 0,15/ml, alors que le nombre de nanoparticules de 5 nm est de $153 \times 10^6/\text{ml}$, soit une augmentation d'un facteur 10^9 par rapport aux particules de $5 \mu\text{m}$. Leur surface totale respective est de $12 \mu\text{m}^2/\text{ml}$ et de $12\,000 \mu\text{m}^2/\text{ml}$, soit une augmentation d'un facteur 1000 par rapport aux particules de $5 \mu\text{m}$ de la surface de contact avec les membranes cellulaires et les molécules biologiques, expliquant une plus grande réactivité biologique des nanoparticules à concentration massique de particules égale, avec une production de radicaux libres et un potentiel pro-inflammatoire accrus (Donaldson et al., 2001). Cela introduit le problème des métriques et de la dose qui seront développés par la suite de nos expérimentations.

La composition chimique ainsi que la structure cristalline des nanoparticules sont aussi des paramètres conditionnant leur activité biologique. Par exemple, la silice sous sa forme cristalline est connue pour être plus toxique que sous forme amorphe (Elias et al., 2000, Gilberti et al., 2008, Governa et al., 2005, Johnston et al., 2000). La nature métallique de la particule ou la présence de métaux de transition, impuretés du processus de fabrication, peuvent également avoir un impact important sur les réponses biologiques. En effet, les métaux de transition, provenant de nanoparticules non manufacturées, sont impliqués dans la génération de radicaux libres de l'oxygène, molécules très réactives pouvant moduler différents processus biologiques et causer des dommages cellulaires (Nel et al., 2006). Par exemple, il a été montré que le fer notamment sous sa forme Fe^{2+} est impliqué dans les effets pathologiques des particules issues de la pollution atmosphérique urbaine (Park et al., 2006, Bachoual et al., 2007). La biodisponibilité du fer provenant de particules en contact avec des cellules épithéliales décroît avec l'augmentation de la taille de la particule (Ball et al., 2000). Dans ce cas, le fer était responsable de l'induction d'une cytokine proinflammatoire, l'interleukine-8 (IL-8). De plus, une autre étude a montré que les différences de comportements de nanoparticules au regard de la toxicité sont pour la plupart causées par un taux et une répartition différente des métaux contaminants de surface, surtout l'aluminium, les groupements silanols et le fer (Fubini et al., 2004). La composition de la chimie de surface des nanoparticules semble donc probablement plus importante encore que la composition chimique intrinsèque puisque l'essentiel des réactions chimiques se fait avec les molécules de surface. La surface de la nanoparticule pourrait donc déterminer les interactions des nanoparticules avec le vivant, mais également moduler leur pénétration au travers des membranes cellulaires. En effet, le revêtement de surface d'une nanoparticule est un paramètre important et probablement plus pertinent que le type de particules pour évaluer la toxicité chez l'homme (Warheit et al., 2007, Hoshino et al., 2007, Clift et al., 2008). Le revêtement de surface peut accentuer ou diminuer la toxicité de la particule mais également moduler la pénétration des nanoparticules dans la cellule ainsi que leur biodistribution (Cho et al., 2009, Faure et al., 2009, Leclerc et al., 2010). Des études expérimentales de Heckel et al. (Heckel et al., 2004) chez des rongeurs exposés par voie intraveineuse à des nanoparticules d'or revêtues d'albumine montrent une transcytose médiée par des récepteurs (protéines de liaison à l'albumine) *via* les caveolae. La

présence de l'albumine et des phospholipides dans le revêtement liquidien des cellules épithéliales alvéolaires pourrait, par conséquent, être un élément important pour faciliter l'absorption épithéliale des nanomatériaux. Ce concept est par ailleurs utilisé en nanomédecine avec la notion de « furtivité » qui permet à une particule chargée d'un principe actif (« nanocarrier ») d'atteindre sa cible (**Hillaireau and Couvreur, 2009, Horcajada et al., 2010**).

Ces observations conduisent à de nouvelles questions concernant les interactions protéines-nanoparticules, plus particulièrement les interactions biomolécules-nanoparticules lors des études ciblées réalisées *in vitro* avec les composants des milieux de culture. En effet, un nouveau concept émerge concernant ces interactions : le concept « corona » (**Lynch et al., 2007, Lundqvist et al., 2008**). Cette couche dynamique de protéines se crée naturellement en milieu biologique et recouvre les matériaux. Lors du contact avec les systèmes vivants, le comportement des nanoparticules en contact avec ces protéines pourrait être grandement modifié. Plusieurs études ont été réalisées au sujet de l'adsorption de molécules à la surface des nanoparticules (**Val et al., 2009, Kendall et al., 2004, Ehrenberg et al., 2009**). Certaines montrent que la réponse cellulaire à un matériau dans un milieu biologique dépend plus de la couche de biomolécules adsorbées que du matériau lui-même. Il apparaît même une notion très importante d'artéfacts qui pourraient exister dans les résultats d'évaluations biologiques dues à ces phénomènes d'adsorption. L'équipe de S. Val souligne dans ces travaux la possibilité d'avoir des résultats biaisés à cause des phénomènes d'adsorption sur les nanoparticules (**Val et al., 2009**). Certaines études soulignent aussi l'importance des protéines du sérum utilisé en culture cellulaire (**Merhi et al., 2011, Ruh et al., 2011**). De plus, les travaux d'une doctorante de notre équipe (M. Pailleux) insistent sur l'importance de prendre en compte outre l'adsorption de biomolécules d'intérêt couramment quantifiées dans les tests de toxicité (TNF, autres cytokines, LDH, protéines du sérum, etc.) sur les nanoparticules, l'adsorption de ces mêmes biomolécules sur les supports de culture *in vitro* (boîtes et plaques), ainsi que la cinétique de dégradation de biomolécules d'intérêt au cours du temps et en fonction de la température. Un système approprié d'équations de correction permettant un recalcul de dosages tels que celui du TNF- α dans les surnageants de culture, en prenant en compte ces paramètres d'adsorption et dégradation, devrait être mis en place pour éviter les résultats artéfactuels. Cette loi de correction devrait s'appliquer pour d'autres biomolécules et d'autres modèles cellulaires.

Enfin, le degré d'aggrégation ou d'agglomération des nanoparticules est généralement imputé aux forces de Van der Waals, aux forces électrostatiques ou aux tensions de surface, ce qui montre que les nanoparticules tendent plus ou moins à s'agglomérer entre elles (**Fubini et al., 2010**). Les nanoparticules peuvent également s'agréger entre elles, si elles sont soumises à des forces plus importantes, rendant ainsi leur séparation plus difficile. Ces agglomérats ou agrégats, allant jusqu'à une dimension micrométrique, peuvent avoir des formes complexes et sont difficiles à caractériser. Les phénomènes d'agglomération et d'aggrégation des nanoparticules peuvent laisser supposer un dépôt différent dans l'appareil respiratoire du fait de la modification de leur diamètre aérodynamique. Les capacités d'agglomération influenceraient donc entre autres la diffusion et la biodistribution des nanoparticules. De plus, comme le laissent supposer les travaux de Wang et al. sur le tractus digestif, l'aggrégation peut influencer la tolérance aux particules. En effet, l'administration orale de nanoparticules de zinc induit le décès d'animaux, lorsque les nanoparticules s'aggrègent dans le tractus gastro-intestinal, alors que les particules de zinc de taille micrométrique n'induisent pas de tels effets (**Wang et al., 2006**). De façon tout à fait intéressante,

la capacité de ces matériaux à former des agrégats par adsorption de protéines a une influence importante dans la clairance des particules et dans leurs effets immunologiques et toxicologiques au niveau de l'appareil respiratoire (**Kendall et al., 2004**). Des changements dans la répartition par taille de nanoparticules de noir de carbone (25 à 100 nm) ont été observés, par rapport à un milieu riche en tampon phosphate de contrôle. La surface d'adsorption semble responsable de l'agglomération et de la réduction de la concentration en phospholipides. La survenue de tels phénomènes dans le surfactant alvéolaire (composé majoritairement de 85% de phospholipides), importants dans le maintien des propriétés mécaniques du poumon, pourrait être un mécanisme influant dans la survenue des effets toxiques des nanomatériaux dans l'appareil respiratoire (**Kendall et al., 2011**).

Les nanoparticules ont aussi tendance à s'agglomérer en milieu biologique (milieu de culture, etc.) lors des tests *in vitro*. Les milieux étant constitués de nombreux composants, les nanoparticules ont la capacité de former des agrégats par adsorption de protéines (**Drescher et al., 2011**). Il est important de tenir compte de l'état d'agglomération/dispersion des nanoparticules sur les systèmes *in vitro*. Dans ce sens, une mesure précise de la valeur du potentiel zêta des nanoparticules utilisées dans chaque étude apparaît indispensable.

Parmi les paramètres physico-chimiques exposés, il ressort que la toxicité des nanoparticules pourra probablement être mieux corrélée à la surface totale, à la surface biologiquement active, au nombre et à la dimension des particules, voire aux propriétés de réactivité des surfaces des particules plutôt qu'à leur masse totale. Ainsi, l'identification du danger des nanoparticules doit se faire selon la nature physico-chimique de la particule dont il est question (**Tsuji et al., 2006**). De plus, chaque évaluation est spécifique à un type particulier de nanoparticules d'où la nécessité de développer des nanoparticules modèles bien caractérisées.

III.2 Nanotoxicologie

Les effets d'une substance toxique sur la santé sont fonction de sa toxicité intrinsèque et de la quantité (dose) de produit en contact avec l'organisme. En effet, chaque substance peut être toxique ou non en fonction de la dose administrée. Paracelse (alchimiste, astrologue et médecin suisse, d'expression Allemande dans les années 1500), parfois considéré comme le père de la toxicologie, a écrit « *Alle ding sind gift, und nichts ohn gift; allein die dosis macht, das ein ding kein gift ist.* » traduit en Français « *Toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison ; seule la dose fait qu'une chose n'est pas un poison* ».

En effet, un des principaux objectifs des études toxicologiques consiste à établir des relations dose-effets, afin de déterminer des doses seuils en dessous desquelles aucun effet sanitaire n'est à craindre. Classiquement ces doses s'expriment en masse. Dans le cas des nanoparticules, il semble que la surface spécifique soit un paramètre important pour la toxicité, ce qui pourrait justifier que la dose soit exprimée en unités de surface.

Les connaissances en toxicologie s'élaborent par l'observation des effets sur l'homme : diagnostic des maladies professionnelles et épidémiologie, et par la toxicologie expérimentale : *in vivo* chez l'animal, *in vitro* sur des cultures cellulaires et *in silico* par modélisation. Le terme de nanotoxicologie est apparu spécifiquement pour les nanoparticules (**Oberdorster et al., 2005**).

D'après le rapport de l'AFSSET datant de 2008, la revue de la littérature montre que, d'une manière générale, les études de toxicologie expérimentale disponibles utilisent chez l'animal des doses élevées et s'intéressent aux effets sanitaires à court terme, ce qui peut correspondre à des situations d'exposition humaine aiguë mais rend les résultats obtenus difficilement extrapolables aux conditions réelles d'exposition chronique en milieu professionnel aussi bien qu'en milieu environnemental (**AFSSET, 2008**). Les connaissances toxicologiques actuelles distinguent deux catégories : les nanoparticules et les nanotubes, qui ont tous deux des comportements différents dans les milieux biologiques, notamment au niveau du transfert dans l'organisme et de la réponse cellulaire. Un des premiers résultats des études toxicologiques est de mettre en évidence la grande variabilité des effets induits par une exposition aux nanoparticules selon leur composition chimique, leur taille, leur surface spécifique, leur forme et leur état de surface. D'autres caractéristiques, comme la présence d'un surfactant, le vécu de la particule dont dépend son état d'aggrégation/agglomération ou sa contamination de surface éventuelle, sont également des paramètres importants de toxicité comme montré précédemment. Ainsi des recommandations ont été établies en 2011 concernant les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux par l'AFSSAPS (**AFSSAPS, Février 2011**). Ce rapport conclue que pour l'évaluation biologique des nanomatériaux, les paramètres physico-chimiques à caractériser de manière générale doivent pouvoir renseigner sur trois critères : l'apparence (taille et distribution de taille, morphologie, état d'aggrégation/agglomération, surface spécifique), la constitution (composition chimique, chimie de surface) et les facteurs influençant les interactions avec les éléments environnants (solubilité/état de dispersion, charge de surface).

Une des grandes interrogations relatives au domaine de la nanotoxicologie concerne cependant la dose de nanoparticules utilisée et la manière d'exprimer cette dose. Dans de nombreuses publications les résultats sont exprimés en dose massique (**Fubini, 1998, Oberdorster et al., 2005**). De cette façon des relations entre la dose massique et la réponse des macrophages (inflammation, stress oxydant) ont été observées pour des poudres de silice par exemple (**Bruch et al., 2004**). Or, comme montré précédemment la taille est un paramètre important car des particules de même nature chimique mais n'ayant pas la même taille n'auront pas le même comportement biologique car les propriétés des nanoparticules diffèrent des propriétés des macroparticules. Dans la pratique, les résultats sont calculés en masse puis convertis en surface. L'équipe d'Oberdorster a montré qu'il était utile de tracer les résultats en surface comme le montre la **Figure 36**. Dans le cadre de cette étude pour les résultats tracés en fonction de la masse (graphiques A et C) les particules de 20 nm montrent une réponse beaucoup plus importante que les particules de 250 nm. Or lorsque les résultats sont exprimés en fonction de la surface concernant le pourcentage de recrutement de neutrophiles (graphiques B et D) les deux réponses se superposent. La réponse surfacique est donc similaire pour les particules de 20 et de 250 nm, alors que la réponse massique ne l'est pas (**Oberdorster et al., 2000**).

De plus, de façon générale, il a été démontré qu'à masse égale, la réponse biologique suite à une exposition à des nanoparticules manufacturées insolubles ou peu solubles ou à des particules ultrafines de dimensions nanométriques est souvent plus importante que pour le même produit à des dimensions micrométriques notamment au plan de l'inflammation pulmonaire, de dommages aux tissus et à l'induction de tumeurs pulmonaires. L'effet biologique mesuré pour les nanoparticules semble davantage corrélé à la surface, à la dimension et au nombre de particules

qu'à la masse, bien que plusieurs autres paramètres puissent substantiellement contribuer à la réponse toxique (Ostiguy et al., 2010).

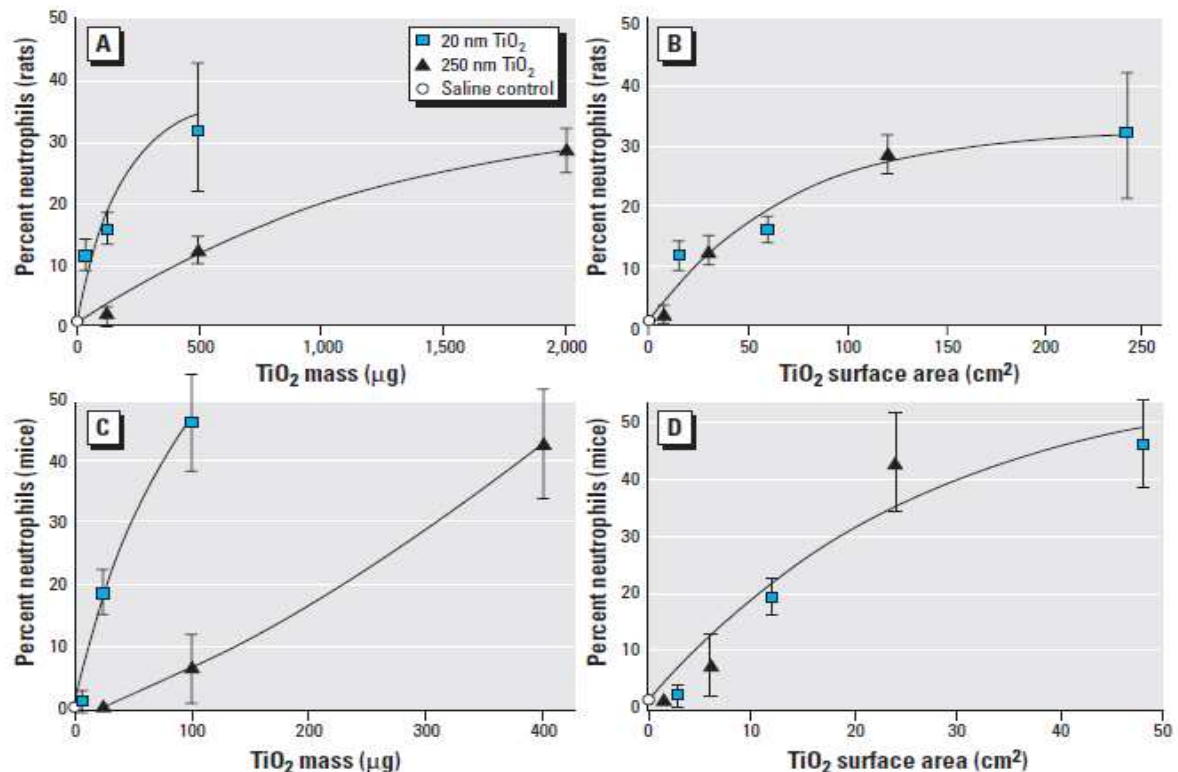


Figure 36 Pourcentage de neutrophiles recrutés dans les alvéoles pulmonaires après 24h d'inflammation déclenchée par instillation intratrachéale de particules de TiO_2 (Oberdörster et al., 2000).

Au cours de notre étude, plutôt que de tracer les résultats en fonction des doses massiques mais aussi en fonction de la surface, nous avons décidé d'utiliser un raisonnement en nombre arbitraire de particules. En effet ce mode était utilisé dans certaines études traitant de l'internalisation de particules (Simon and Schmid-Schonbein, 1988, Steinkamp et al., 1982). L'idée étant d'aboutir à une quantification précise du nombre de particules internalisées par cellule avec au départ une quantité de nanoparticules non limitante.

Une fois la question de la dose de nanoparticules exposée, nous allons définir les différents paramètres biologiques pertinents et indispensables à évaluer pour une étude de nanotoxicologie.

Malgré les informations limitées sur les risques sanitaires liés aux nanoparticules manufacturées, il existe de nombreuses connaissances sur la toxicité des particules ultrafines de dimensions nanométriques. Ainsi, les mécanismes biologiques de réponse pulmonaire tels le stress oxydatif, l'inflammation, la production de chimiokines et de cytokines et les facteurs de croissance cellulaire semblent constituer une réponse commune aux deux types de particules de dimensions nanométriques (Oberdörster et al., 2005, Donaldson et al., 2002, Donaldson and Stone, 2003), sans oublier que toute modification de surface est susceptible d'altérer substantiellement la toxicité (Fubini et al., 2010, Hoshino et al., 2007). La réactivité en milieu biologique dépendrait de la micromorphologie au niveau atomique et de l'histoire mécanique, thermique et chimique de la particule (Fubini, 1998). Une légère altération de l'état de surface de la particule modifie le

potentiel cancérigène donc les propriétés physico-chimiques de la particule influent sur ses effets toxiques.

Le stress oxydant est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées (ROS, Reactive Oxygen Species en anglais) et aux espèces réactives oxygénées et azotées (RONS, N pour Nitrogen en anglais) oxydantes. Ces espèces sont, par définition, des radicaux libres. Par assimilation, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est considéré comme un ROS car, en présence de fer (sous forme ionique), il se dismute en deux radicaux hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) (réaction de Haber-Weiss).

Voici les principaux exemples de ROS et RONS décrits : l'ion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion hypochlorite (ClO^-), le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$), les radicaux peroxyde ($\text{ROO}\cdot$) et le radical alkoxyde ($\text{RO}\cdot$) où R est une chaîne carbonée, les radicaux dérivant d'acides gras insaturés, le peroxynitrite ($\text{ONOO}\cdot$), le monoxyde d'azote (NO) et le dioxygène singulet (O_2).

La production de ROS et RONS est normale pour tous les organismes vivant en aérobie et ne constitue pas, en soi, une situation de stress oxydant. En effet, la cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ROS comprenant des enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, etc.) et des petites molécules (vitamine E, vitamine C, etc.). En situation physiologique, l'ion superoxyde (O_2^-) est produit essentiellement par les NADPH oxydases (NOX) dont on connaît cinq isoenzymes et le monoxyde d'azote (NO) par la famille des NO synthases (trois isoformes). La **Figure 37** indique les principales réactions aboutissant à des ROS ainsi que les principales réactions de détoxification des ROS.

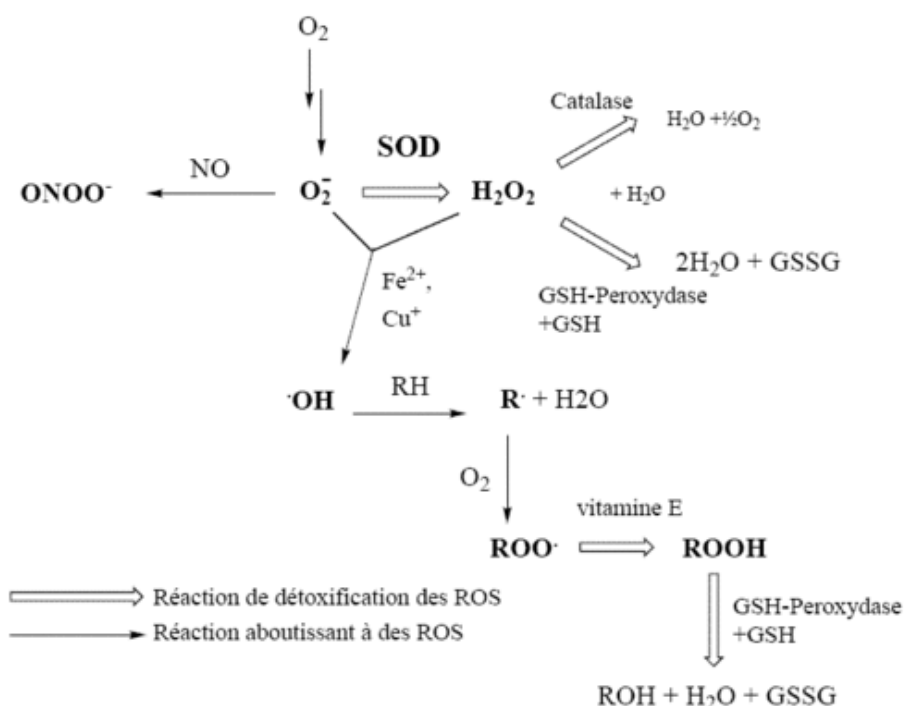


Figure 37 : Les espèces réactives oxygénées et leur système de détoxification (version simplifiée). SOD : superoxyde dismutase, GSH-peroxydase : glutathion peroxydase. Si ce système est submergé, il y a une situation de stress oxydant (Wikipedia.org).

Le stress oxydant devient une situation pathologique dès que le système de protection est submergé par les ROS et les RONS.

Ceci peut être par exemple dû à :

- L'introduction dans la cellule de radicaux libres ou d'espèces réactives oxygénées (polluants photochimiques pénétrant l'organisme via le système respiratoire, l'alimentation ou les muqueuses)
- Une surproduction de ROS et RONS induite par des processus de type ischémie-reperfusion qui sont à l'origine d'une partie des rejets des greffes ou à la présence de certains composés chimiques prooxydants tels que le méthyl viologène.
- Un défaut du système de protection, par exemple une mutation inactivant une des enzymes du système de protection ou une carence en une des vitamines.
- L'introduction dans la cellule ou dans un organe de molécules hautement réactives, par exemple des nanoparticules (très petites et à surface spécifique très développée). Si ces nanoparticules sont nombreuses, les macrophages n'arrivent plus à les traiter et peuvent libérer leurs oxydants dans l'organisme en provoquant une réaction inflammatoire exacerbée.

Le stress oxydant est un facteur d'inflammation et de mutagenèse, mais il est aussi considéré comme une des principales causes de cancer et jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer, comme dans plusieurs pathologies plus courantes telles que les maladies cardio-vasculaires, les accidents cérébro-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde ou les cataractes. Les antioxydants bien dosés pourraient théoriquement diminuer ces dégâts mais cela reste à démontrer.

La production de ROS à la surface de particules mais aussi par les cellules phagocytaires en contact a été mise en évidence entre autres par l'équipe de B. Fubini (**Fubini and Hubbard, 2003**). Les ROS produits de façon normale par le métabolisme de l'oxygène sont fortement réactifs à cause de la présence d'électrons de valence libre et sont impliqués dans les mécanismes de signalisation cellulaire, d'apoptose et de prolifération cellulaire. La revue de la littérature de l'équipe de M.R. Gwinn et al. (**Gwinn and Vallyathan, 2006**) confirme que les ROS sont impliqués dans la transduction de signaux chez les macrophages. Cependant, pendant des périodes de stress environnemental, le niveau des ROS peut augmenter considérablement provoquant des dommages significatifs à la structure des cellules. Ce phénomène est connu sous le nom de stress oxydant. Il apparaît que la surface de la particule joue un rôle crucial sur la réponse biologique et qu'il y a une extrême variabilité du potentiel pathogénique suivant la source de silice ou autre nanoparticule.

Nous avons ensuite comparé dans la littérature les différents modes d'évaluations de toxicité en fonction des conditions d'études. Il est rapidement apparu qu'aucun protocole standardisé n'existait pour les analyses de toxicité des nanoparticules. Dans un premier temps, trois publications nous ont renseignées sur des évaluations *in situ* (**Johnston et al., 2000, Seiler et al., 2004, Warheit et al., 2007**). L'équipe de Johnston utilisait une chambre aérosol pour faire inhaler à des rats des particules de silice amorphe ou cristalline. Les deux autres équipes travaillaient par instillation intra-trachéale avec différents types de particules (quartz, silice, etc.). Les différentes équipes cherchaient ensuite à évaluer la charge pulmonaire en particules et utilisaient des techniques variées d'analyse sur des lavages broncho-alvéolaires : prolifération cellulaire, analyses morphologiques et histologiques, mesure des protéines totales, fibronectine, évaluation de l'enzyme LDH, glucuronidase, inflammation (MIP-2, TNF- α), surfactant pulmonaire, Ki-67

(marqueur de prolifération), p53 (cycle cellulaire), potentiel hémolytique, fibrose et apoptose par immunohistochimie. Une autre étude nous a renseignée sur la condition *ex-vivo* (**Bruch et al., 2004**) où des contacts ont été réalisés entre des particules de quartz et des cultures de macrophages de cochons d'inde et de rats obtenus par LBA. La viabilité cellulaire était mesurée, ainsi que la LDH, glucuronidase, ROS et TNF- α . Les études suivantes concernaient des évaluations *in vitro* (**Elias et al., 2000, Gozal et al., 2002, Cakmak et al., 2004**). Dans ces études, les particules (silice, quartz, etc.) ont été mises en contact avec des lignées cellulaires comme les SHE (Syrian Hamster Embryo), des macrophages murins ou encore une lignée de cellules épithéliales de poumon humain. Différentes analyses de cytotoxicité ont ensuite été réalisées sur ces cultures après contact : viabilité cellulaire (bleu trypan), TNF- α , NF- κ B (nuclear factor-kappa B), apoptose, LDH, essai MTT (sel de tétrazolium), essai comète. Enfin, une dernière étude combinait les approches *in vitro* et *in situ* (**Sayes et al., 2007**). Cinq types de particules ont été étudiés sur deux types de lignées cellulaires (cellules épithéliales de poumon immortalisé et macrophages de rats). L'inflammation a été évaluée sur les LBA de rats exposés (MIP-2, TNF- α , IL-6) ainsi que sur d'autres évaluations comme la LDH et l'essai MTT. L'étude montrait une bonne corrélation entre les données *in vivo* et les études *in vitro*.

Ces différentes évaluations de cytotoxicité sont couramment utilisées dans la littérature. La LDH est une enzyme normalement compartimentée dans le cytoplasme utilisée comme marqueur de mort cellulaire lorsqu'il se produit une perte d'intégrité membranaire et comme marqueur de l'hémolyse. En effet, les cellules détruites entraînent un taux élevé de LDH. La glucuronidase, le bleu trypan et l'essai MTT sont utilisés comme marqueurs de viabilité. La mesure de MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) permet d'évaluer l'inflammation cellulaire tout comme le TNF- α qui est une cytokine impliquée dans l'inflammation systémique, la mort cellulaire par apoptose, la prolifération cellulaire, la différenciation, la tumorigenèse, et la réplication virale. Le test des comètes est un test de génotoxicité qui permet d'apprécier les altérations primaires de l'ADN induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages et enfin lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose. Après électrophorèse, les noyaux dont l'ADN a subi des cassures prennent différentes natures selon que le test soit réalisé en condition neutre ou alcaline. Il en résulte que la répartition des fragments s'assimile visuellement à une forme de comète.

Ces études réalisées sur la toxicité des particules font toutes état de la grande importance des propriétés physico-chimiques de surface qui influeraient sur l'activité biologique. De façon générale, les résultats sont variables en fonction du type de particules testées, mais conduisent à des modifications notables au niveau biologique. Il apparaît que de nombreux tests sont réalisés ayant tous pour objectif d'évaluer la cytotoxicité mais il n'existe à ce jour aucun consensus clairement défini, d'où les difficultés de comparaison des travaux inter-équipes. Ceci souligne l'importance de progresser sur ce point notamment par le biais de programmes à large échelle internationale (NanoimpactNet, Nanotoxicology, etc.).

Au regard de ces principaux paramètres cellulaires et moléculaires analysés dans les tests de toxicité des nanoparticules avec les notions incontournables de mort cellulaire, inflammation, stress oxydant et génotoxicité, nous avons défini les analyses qui nous semblaient indispensables pour structurer une plateforme d'évaluation de la toxicité avec les points incontournables à tester (**Boumahdi, 2009**). Notre étude s'est concentrée sur des analyses *in vitro* de différents paramètres

tels que le TNF- α , la LDH et le stress oxydant d'après l'existant, ce qui nous a amené à choisir nos propres méthodologies en complément des observations morphologiques (**Figure 38**).

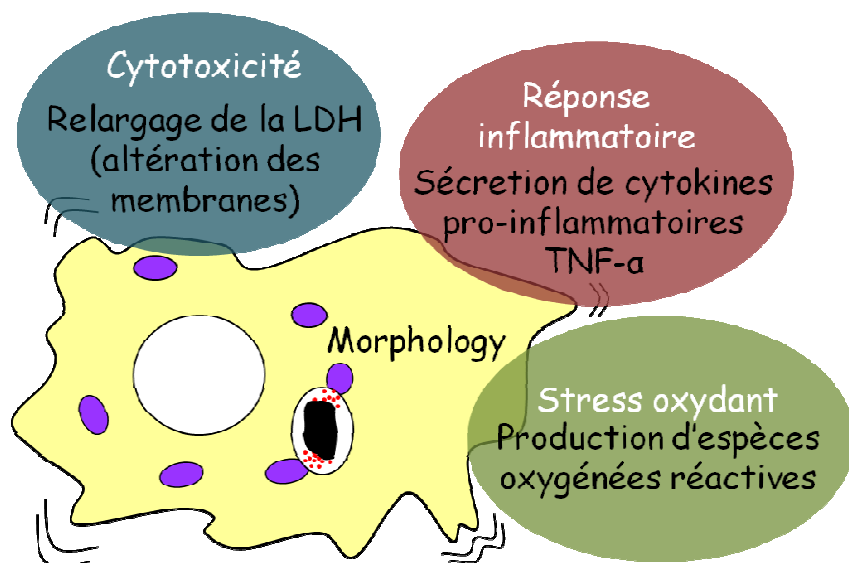


Figure 38 : Paramètres biologiques permettant l'évaluation de la toxicité des nanoparticules mis en place (Adapté de Boumahdi, 2009).

De plus, il apparaît que les paramètres physico-chimiques ne sont pas toujours bien caractérisés dans les études toxicologiques, ce qui peut expliquer le caractère parfois contradictoire de certains résultats (**Lanone et al., 2009**). La «nanotoxicologie» est une science récente, en construction, si bien que les données qui en sont issues sont encore peu nombreuses, disparates et parfois contradictoires. Il est cependant important de souligner que pour la première fois peut-être dans l'histoire des sciences et de l'industrie, le développement d'un secteur technologique industriel nouveau s'accompagne dès son origine d'une prise en compte des risques potentiels associés, que ce soit pour la santé ou pour l'environnement. Malheureusement, les études de toxicité biologique des nanoparticules se heurtent à l'absence de consensus d'évaluation standardisée et à la difficulté de mise en place de modèles expérimentaux. Il est difficile de définir un modèle unique qui pourrait servir à l'ensemble des études de toxicité. Certains éléments structuraux ont été retenus comme étant ceux qui pourraient avoir le plus grand impact sur l'activité biologique des nanoparticules : taille, forme, composition chimique, chimie de surface et capacité d'agglomération (**Andujar et al., 2009**). Les études de toxicité menées sur les nanomatériaux devraient donc s'attacher à tester un large échantillonnage de structures afin de déterminer quels sont les paramètres physico-chimiques permettant de prévoir l'impact d'une nanoparticule donnée sur le vivant. Actuellement, une caractérisation satisfaisante de l'exposition ne peut plus se limiter à la masse de produit même si la littérature scientifique ne permet pas encore de déterminer quel serait le meilleur paramètre pour mesurer l'exposition. Dans ce sens, l'équipe de Warheit et al. (2009) préconise que les toxicologues caractérisent les nanoparticules au minimum pour les paramètres suivants : les dimensions et la distribution granulométrique des nanoparticules élémentaires, leur forme, la surface spécifique, la charge de surface, la composition et la pureté, la forme cristalline et le niveau de cristallinité, les recouvrements et la composition de surface, l'état d'agrégation, la réactivité de surface des particules et la méthode de synthèse incluant les traitements post-synthèse (**Warheit, 2010**).

Pour conclure, les différentes données de la littérature font ainsi ressortir l'importance de compétences interdisciplinaires nécessaires pour appréhender toute la complexité du domaine « nano ». En effet ce n'est que par la collaboration entre physico-chimistes et biologistes que les avancées technologiques progresseront notamment en termes de compréhension de la nanotoxicologie.

IV. Approche expérimentale

Le Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées (LINA) est un laboratoire interdisciplinaire mis en place depuis 2009 dans le cadre de l'IFR 143 (IFRESIS – Institut Fédératif de Recherche en Science Ingénierie et Santé) sous l'impulsion conjointe de la faculté de Médecine de l'Université Jean Monnet et de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne (EMSE). Le LINA a labellisé équipe d'accueil (EA 4624) après évaluation par l'Agence d'Evaluation de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (AERES) en 2011. Il réunit, autour du thème des nanoparticules, les compétences en physique/chimie du solide de l'EMSE et les compétences médicales et biologiques variées des biologistes, médecins et chirurgiens de l'Université Jean Monnet et du Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne. L'évaluation et la recherche en matière d'activité biologique des nanoparticules constitue la thématique transversale de l'équipe, en se focalisant sur les questions fondamentales de biodistribution, de biopersistance et de biotoxicité grâce à l'utilisation de nanoparticules industrielles ou synthétisées à façon à l'échelle du laboratoire (nanoparticules dites « modèles »).

Le développement des nanotechnologies et nanomatériaux est en plein essor et conduit par conséquent à de nombreux questionnements sur les interactions de ces nouveaux objets avec le vivant. Plus particulièrement, de nombreuses interrogations concernent l'impact des nanotechnologies au niveau environnemental mais aussi au niveau du corps humain, notamment aux échelles tissulaire, cellulaire et moléculaire. De manière générale, ce travail de thèse porte sur la compréhension des mécanismes d'internalisation de particules fluorescentes de dimension nanométrique à l'échelle cellulaire. Dans ce contexte, l'impact des paramètres physico-chimiques des nanoparticules sur ces phénomènes d'internalisation semble jouer un rôle clé et sera mis en rapport avec la notion très importante de nanotoxicologie.

Le travail d'un premier doctorant (Najih Boumahdi) de notre équipe, avait permis en 2009 l'étude des effets biologiques *in vitro* de poudres industrielles fines et ultrafines de carbure de silicium (SiC) sur une lignée cellulaire de macrophages. L'objectif portait entre autres sur l'établissement d'essais standardisés pour évaluer la cytotoxicité de ces particules d'origine industrielle. Différents types de particules de SiC, dont le diamètre moyen était essentiellement compris entre 1 et 14 μm , mais dont les procédés de fabrication différaient ont été utilisés. Ce travail est poursuivi par une autre doctorante (Mélodie Pailleux) sur un nouveau type de particules d'hydroxyde d'aluminium (boehmite). Pour ces deux études, le travail consistait à caractériser très précisément les paramètres physico-chimiques des particules d'origine industrielle (SiC et boehmite) et d'évaluer les effets cytotoxiques sur un modèle *in vitro* de macrophages. L'ensemble de ces travaux relève d'un partenariat étroit avec la société Saint-Gobain qui produit ou utilise ces matériaux pulvérulents.

Au niveau des analyses biologiques, il est apparu au cours de ces travaux qu'une des limites concernait l'évaluation de la quantité de particules réellement internalisées par les macrophages. Or au vu des données limitées de la littérature, il semble indispensable d'étudier la relation entre le niveau de toxicité et la quantité précise de particules internalisées par les cellules. Des données préliminaires au laboratoire ont montré qu'en analyse d'images il est impossible d'effectuer une

quantification des particules micrométriques phagocytées sur des acquisitions d'images en deux dimensions à partir d'étalements cellulaires sur lames. En effet, sur ce type d'images il est impossible de distinguer avec certitude les particules intracellulaires des particules accolées à la face externe de la membrane plasmique (**Figure 39**).

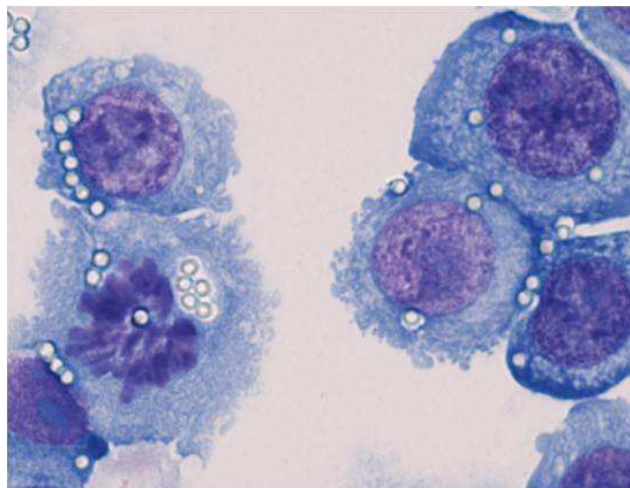


Figure 39 : Image réalisée en microscopie photonique après coloration cytologique par la méthode de May Grünwald Giemsa (MGG) sur des macrophages de la lignée RAW 264.7 mises en contact avec des billes de 2 μm de diamètre au ratio de 10 billes pour une cellule (10/1 ϕ) après 6 heures d'incubation (objectif x60).

Afin de pallier ces inconvénients avec les acquisitions en deux dimensions, il est apparu nécessaire d'utiliser une approche en trois dimensions grâce à la microscopie confocale couplée à un marquage fluorescent adapté afin de visualiser les membranes cellulaires et distinguer le matériel intracellulaire et extracellulaire. La volonté d'utiliser des techniques de microscopie à fluorescence nous a conduits à utiliser, puis développer, différents modèles de particules et nanoparticules fluorescentes dites « modèles ».

Ainsi, ce travail de thèse s'inscrit d'un point de vue fondamental, sur la compréhension des mécanismes d'internalisation de ce type de particules par les macrophages, et le développement d'un protocole de quantification de l'internalisation conjuguant des approches techniques complémentaires. Ces particules modèles devraient permettre la recherche d'une corrélation entre la quantification de leur l'internalisation, leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs effets biologiques en terme de biotoxicité (**Figure 40**).

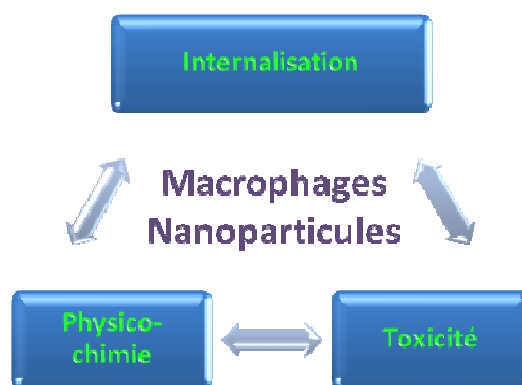


Figure 40 : Diagramme représentant l'objectif des liens à établir au cours de cette étude.

Afin d'essayer de répondre à cette problématique, après un état de l'art des données de la littérature, le travail expérimental réalisé au cours de cette thèse a été structuré en trois grandes parties :

- Dans un premier temps nous avons effectué les mises au point des techniques de quantification de l'internalisation avec un modèle de microparticules commerciales correspondant à des billes de latex fluorescentes de taille et surface définies. Le processus de phagocytose était privilégié du fait de l'utilisation d'une lignée cellulaire de macrophages.
- Nous avons ensuite cherché à développer notre propre outil de quantification pour des particules à l'échelle nanométrique. Nous avons co-développé avec la société Nano-H des nanoparticules fluorescentes à façon plus ou moins sensibles aux variations de pH intracellulaire afin de parvenir à une quantification précise des nanoparticules présentes au sein des phagolysosomes.
- Nous avons ensuite évalué l'impact de deux paramètres physico-chimiques, la taille et la charge de surface des nanoparticules, sur la capacité d'internalisation des macrophages et sur le niveau de toxicité généré lors des contacts *in vitro*.

Chacune de ces parties conduira à la rédaction d'une publication et constituera un chapitre de cette thèse.

Concernant le choix des microparticules fluorescentes nous avons dans un premier temps décidé de travailler avec des particules micrométriques fluorescentes dont les caractéristiques taille et groupements de surface et l'observation sont plus facilement contrôlées (**Torche et al., 1999, Steinkamp et al., 2000, Steinkamp et al., 1982, Simon and Schmid-Schonbein, 1988, Moller et al., 2002**). Ces particules de taille micrométrique, ont permis les mises au point techniques notamment en cytométrie en flux (quantification de la phagocytose au niveau membranaire et intracytoplasmique grâce à la mise en place d'un quenching au bleu trypan) et microscopie confocale (visualisation du processus de phagocytose et localisation cellulaire des particules).

Par la suite, pour travailler au niveau nanométrique, nous avons envisagé l'utilisation de quantum dots (Qdots®) (**Pan et al., 2006**). Les Qdots® sont des nanocristaux de taille et fluorescence variables dont l'utilisation principale est la réalisation d'études de « tracking cellulaire » (**Jamieson et al., 2007**). Leur revêtement de surface a donc été adapté pour être plus facilement absorbable par la cellule (internalisation facilitée). Par ailleurs, des premières études semblent montrer que certains Qdots® présentent une toxicité cellulaire non négligeable (**Hoshino et al., 2007**). Compte-tenu de ces caractéristiques, et du biais qui pourrait être obtenu dans les résultats, l'approche d'une quantification de la phagocytose par les Qdots® a été abandonnée.

Nous avons enfin fait appel à une société de la région (Nano-h), pour créer nos propres nanoparticules et contrôler ainsi leur synthèse et leurs paramètres physico-chimiques (taille, charge, fluorescence) selon un cahier des charges bien défini.

Les principales particules et nanoparticules étudiées au cours de ces travaux de thèse ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le **Tableau 6**. Par abus de langage, la dénomination de nanoparticule est employée pour les particules inférieures à 1000 nm et non pas uniquement pour les particules inférieures à 100 nm comme le définit la norme ISO TS/27687.

	Principales particules étudiées	Composition	Taille (nm)	Fluorophore	Fonctionnalisation de surface
Article 1	Microparticules P	Latex	2000	FITC	Carboxylate
	Microparticules I		1000		Amine
Article 2	Nanoparticules FITC	Silice	250 et 500	FITC	Carboxylate
	Nanoparticules FITC/pHrodo		250 et 500	FITC et pHrodo	
Article 3	Nanoparticules FITC		150	FITC	Carboxylate
			250		
			500		
			850		

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des principales particules et nanoparticules étudiées ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Quantification de l'internalisation de particules micrométriques

I.1 Introduction et méthodologie

Ce chapitre est focalisé sur la mise au point d'une quantification du processus de phagocytose dans une lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7 (*ANNEXE I*) de façon à mieux appréhender les mécanismes de toxicité.

Dans le cadre du développement d'un modèle de « particules micrométriques », dédié à l'étude de l'internalisation cellulaire, trois types de particules (billes) de polymère fluorescentes ont été utilisés :

- Des particules de polystyrène fluorescentes de 2 µm de diamètre possédant en surface des groupements carboxylate que nous avons appelées **billes P** (Fluoresbrite® YG carboxylate microspheres, 2.00 µm ; Polyscience). Ces billes ont un maximum d'excitation à 441 nm et un maximum d'émission à 486 nm (fluorescence verte).
- Des particules de polystyrène fluorescentes de 1 µm de diamètre possédant en surface des groupements amine que nous avons appelées **billes I** (FluoSpheres® YG amine-modified microspheres, 1.0 µm ; Invitrogen). Ces billes ont un maximum d'excitation à 505 nm et un maximum d'émission à 515 nm (fluorescence verte).
- Des particules de polymère (latex) fluorescentes de 2 µm de diamètre possédant en surface des groupements amine que nous avons appelées **billes S** (Latex Beads, Polystyrene amine modified, fluorescent yellow green, 2.0 µm ; Sigma). Ces billes ont un maximum d'excitation à 470 nm et un maximum d'émission à 505 nm (fluorescence verte).

Différentes techniques de microscopie ont été employées pour la visualisation des macrophages et des particules fluorescentes : microscopie photonique après coloration standard (*ANNEXE II*), microscopie à épifluorescence, microscopie confocale (*ANNEXE II.1*) et microscopie électronique (*ANNEXE II.2*). Des mises au point ont dans un premier temps concerné des marquages fluorescents pour les analyses en microscopie confocale

Pour les premiers essais de phagocytose, un ratio arbitraire de 10 billes pour une cellule (10/1φ) a été introduit dans les cultures. De même, le temps d'incubation entre les billes et les cellules a été fixé arbitrairement à 90 minutes pour la réalisation des premières mises au point techniques. Par la suite les concentrations et les temps de contact entre les macrophages et les particules ont été adaptés à chaque technique utilisée.

A noter que les billes P et I ont été utilisées avec toutes les techniques décrites par la suite, tandis que les billes S n'ont trouvé leur application qu'en microscopie à fluorescence (épi-fluorescence et confocale).

Une technique de quantification de la phagocytose en CMF a été mise au point grâce à l'utilisation judicieuse du quenching au bleu trypan permettant la distinction des billes internalisées de celles adhérentes à la membrane, en parallèle du développement de témoins de non

phagocytose. Le principe de la CMF, qui a représenté l'essentiel de ce premier travail, est détaillé en **ANNEXE II.3**.

Le paramètre morphologique que nous avons étudié, en parallèle des paramètres de fluorescence, a été le Side Scatter (SSC) correspondant à la diffusion (somme de la diffraction et de la réfraction) des rayons incidents récupérés à 488 nm (filtre bande passante 488/10 nm) selon un angle α de 90° par rapport à l'axe de la lumière incidente. Ce paramètre correspond à la granularité et à la complexité intracellulaire, il est ainsi le reflet de la présence des particules à la fois à la surface des cellules mais aussi internalisées. Cette somme de deux phénomènes a été quantifiée avec la moyenne géométrique du paramètre SSC (Y Geo Mean). En parallèle, pour chaque acquisition, le seuil de détection de taille (FSC – Forward Scatter) était fixé au dessus de la taille des débris et des particules seules de façon à ne détecter que les cellules.

Pour l'analyse des paramètres de fluorescence, la longueur d'onde d'excitation a été fixée à 488 nm grâce à un laser Enterprise II Argon et a permis d'exciter chacun des fluorochromes utilisés (fluorescéine des microparticules et iodure de propidium). La fluorescence émise par les particules après excitation à 488 nm a été récupérée grâce à un filtre bande passante 530/30 nm (canal FL1) et la fluorescence émise par l'excitation de l'iodure de propidium à 488 nm a été récupérée grâce à un filtre bande passante 695/40 nm (canal FL3).

D'après certaines données de la littérature (**Nuutila and Lilius, 2005, Hed et al., 1987, Van Amersfoort and Van Strijp, 1994**), le bleu trypan (BT), outre son utilisation en tant que colorant d'exclusion des cellules mortes pour les numérations cellulaires, pourrait « éteindre » la fluorescence verte des particules se situant à l'extérieur des cellules et ainsi permettre la distinction entre les particules internalisées des particules qui sont justes adhérentes à la membrane plasmique (**Figure 41**).

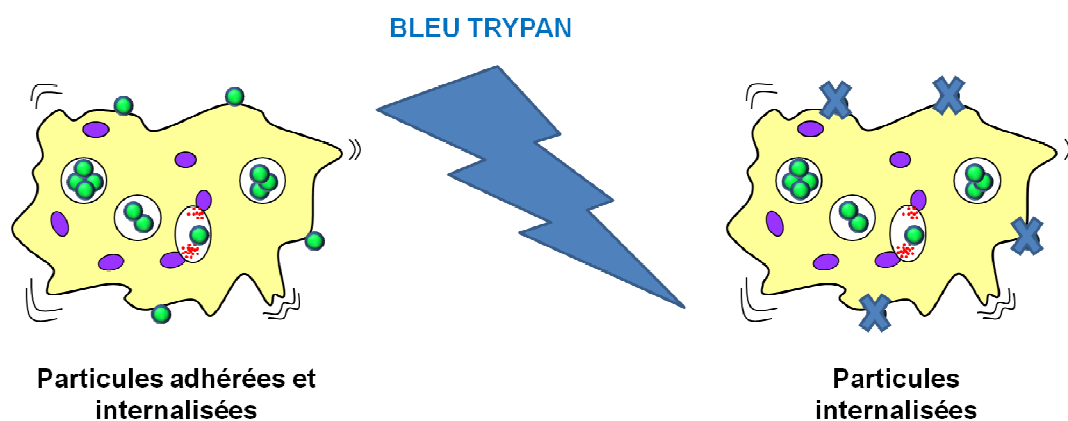


Figure 41 : Schéma simplifié du fonctionnement du quenching au bleu trypan.

Ainsi, au cours de chacune des expériences réalisées en CMF nous avons réalisé parallèlement les analyses avec et sans BT.

L'analyse de ces paramètres de fluorescence nous a ainsi permis :

- De quantifier le pourcentage de mortalité cellulaire (cellules iodure de propidium positives) en faisant la distinction entre les cellules mortes sans billes (cellules iodure de propidium positives/fluorescence verte négative) et cellules mortes avec billes (cellules iodure de propidium positives/fluorescence verte positive) dans chaque échantillon par analyse simultanée des canaux FL1 et FL3. De plus, un fenêtrage réalisé sur les cellules

iodure de propidium négatives permettait de ne travailler qu'avec les cellules vivantes pour quantifier le processus dynamique de phagocytose.

- De mesurer l'intensité moyenne de fluorescence totale émise par les billes P ou I (internalisées et adhérentes à la membrane) que nous avons appelé MFI totale (Mean Fluorescence Intensity). Ces valeurs ont été obtenues pour la condition sans BT sur le canal FL1.
- De quantifier le pourcentage de cellules ayant internalisé des billes P ou I que nous avons appelé «pourcentage de cellules phagocytantes». Ces valeurs ont été obtenues pour la condition avec BT sur le canal FL1.

Pour résumer, en CMF quatre paramètres ont été quantifiés simultanément pour chaque échantillon : le pourcentage de cellules mortes, la MFI totale, le pourcentage de cellules phagocytantes et la moyenne du SSC.

Enfin les différents paramètres de toxicité tels qu'ils ont été décrits dans le chapitre précédent ont été évalués : TNF- α , LDH, stress oxydant (**ANNEXE II.5**).

Ces travaux sont résumés dans la publication suivante publiée dans la revue *Inhalation Toxicology* en 2010.

I.2 Publication 1

Inhalation Toxicology, 2010; 22(13): 1091–1100

informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE

Quantification of micro-sized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms

L. Leclerc^{1,2,3}, D. Boudard^{1,4,5}, J. Pourchez^{1,2}, V. Forest^{1,2}, O. Sabido^{4,6}, V. Bin^{1,4}, S. Palle^{4,7}, P. Grosseau³, D. Bernache^{2,3}, and M. Cottier^{1,4,5}

¹LINA Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées, F-42023, Saint-Etienne, France, ²Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Centre Ingénierie et Santé, Saint-Etienne, France, ³Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, LPMG, UMR CNRS 5148, F-42023, Saint-Etienne, France, ⁴PRES Lyon - Université Jean Monnet, Faculté de Médecine, IFR Inserm 143, F-42023, Saint-Etienne, France, ⁵Laboratoire d'Histologie CHU de Saint-Etienne, F-42055, Saint-Etienne, France, ⁶PRES Lyon Université Jean Monnet, Centre Commun de Cytométrie en Flux, F-42023, Saint-Etienne, France, and ⁷PRES Lyon Université Jean Monnet, Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique, Pôle Optique et Vision, F-42023, Saint-Etienne, France

Abstract

Background: The use of micro- or nanometric particles is in full expansion for the development of new technologies. These particles may exhibit variable toxicity levels depending on their physicochemical characteristics. We focused our attention on macrophages (MA), the main target cells of the respiratory system responsible for the phagocytosis of the particles. The quantification of the amount of phagocytosed particles seems to be a major element for a better knowledge of toxicity mechanisms. The aim of this study was to develop a quantitative evaluation of uptake using both flow cytometry (FCM) and confocal microscopy to distinguish entirely engulfed fluorescent micro-sized particles from those just adherent to the cell membrane and to compare these data to *in vitro* toxicity assessments.

Methods: Fluorescent particles of variable and well-characterised sizes and surface coatings were incubated with MA (RAW 264.7 cell line). Analyses were performed using confocal microscopy and FCM. The biological toxicity of the particles was evaluated [lactate dehydrogenase (LDH) release, tumor necrosis factor (TNF)- α , and reactive oxygen species (ROS) production].

Results and conclusion: Confocal imaging allowed visualization of entirely engulfed beads. The amount of phagocytic cells was greater for carboxylate 2- μ m beads ($49 \pm 11\%$) than for amine 1- μ m beads ($18 \pm 5\%$). Similarly, side scatter geometric means, reflecting cellular complexity, were 446 ± 7 and 139 ± 12 , respectively. These results confirm that the phagocytosis level highly depends on the size and surface chemical groups of the particles. Only TNF- α and global ROS production varied significantly after 24-h incubation. There was no effect on LDH and H_2O_2 production.

Keywords: Phagocytosis quantification; macrophages; fluorescent micro-sized particles; flow cytometry; confocal microscopy; *in vitro* toxicity evaluations

Introduction

The toxicological assessment of fine and ultrafine particles (and particularly nanoparticles) represents a considerable current issue for environmental science, biosciences, or nanomedicine (Warheit et al., 2004; Oberdörster et al., 2005;

Sayes et al., 2007). To better understand the toxicity of particles, it seems of high interest to determine the number of internalised particles into the cells after exposure (Haberkott et al., 2007; Clift et al., 2008). Different particle entry pathways exist in the human body: skin, gastrointestinal tract,

Address for Correspondence: Lara Leclerc, Centre Ingénierie et Santé IFR INSERM 143 - LPMG UMR CNRS 5148, École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne 158, Cours Fauriel - 42023 Saint-Etienne Cedex 2, France. Tel: (+33)-4-77-42-14-25; Fax: (+33)-4-77-42-14-89. E-mail: leclerc@emse.fr

(Received 01 July 2010; revised 25 August 2010; accepted 07 September 2010)

ISSN 0895-8378 print/ISSN 1091-7691 online © 2010 Informa Healthcare USA, Inc.
DOI: 10.3109/08958378.2010.522781

<http://www.informahhealthcare.com/ihl>

respiratory tract, or by injection. We particularly focus our attention on the respiratory way and its main target cells: the macrophages (MA). These cells are major performers of phagocytosis, a highly conserved complex process, classically defined as the internalization and destruction of particles greater than 0.5 μm in size. It is a receptor-mediated and actin-driven process. Phagocytic uptake involves actin dynamics including polymerization, bundling, contraction, severing and depolymerization of actin filaments (Aderem and Underhill, 1999; Fenteany and Glogauer, 2004; Niedergang and Chavrier, 2004, 2005; Ravetch and Aderem, 2007). The physicochemical characteristics of particles may also influence the phagocytic process (Serda et al., 2009), and they have also been shown to be involved in the mechanisms of toxicity (Fubini 1998; Fubini et al., 2004; Clift et al., 2008).

It appears of great interest to quantify the phagocytic process, and compare these data with the toxicity of particles regarding their physicochemical characteristics. Preliminary results have shown that it is impossible to accurately quantify phagocytosis using two dimension images acquired from cell smears where internalised particles can hardly be distinguished from particles placed at the outer surface of the plasma membrane.

In this context, our work aimed at developing a simple, direct, cost effective, reproducible and easy to perform phagocytosis quantification technique on an *in vitro* MA cell line (RAW 264.7). The MA were incubated with micro-sized model particles that are fluorescent beads whose physicochemical characteristics (i.e. size and chemical coating) and observations are more easily controlled (Jones et al., 2002; Champion et al., 2008; Hasegawa et al., 2008).

Preliminary confocal observations allowed to distinguish the localization of particles without an accurate quantification of the phagocytic process.

To perform a phagocytosis quantification, we adapted an existing analysis using a Trypan blue (TB) quenching in flow cytometry (FCM) (Hed et al., 1987; Nuutila and Lilius, 2005; Thiele et al., 2001; Van Amersfoort and Van Strijp, 1994). In addition to its principal function as an exclusion dye of dead cells, TB is known for its ability to 'turn off' the green fluorescence emitted by the beads outside the cells. This process allowed us to distinguish internalised beads from those just adhering to the plasma membrane. This approach has been improved by combining side scatter (SSC) measurement with fluorescent mean intensity of beads without and with TB.

Because of the role played by actin filaments for the initiation phase of the phagocytic process, we used different actin polymerization inhibitors such as Cytochalasin-D (Cyt-D) (Möller et al., 2002; Haberzettl et al., 2007; Kanno et al., 2007), Latrunculin-A (Lat) (de Oliveira and Mantovani, 1988; Oliveira et al., 1996, 1997; DeFife et al., 1999), Jasplakinolide (Jasp) (Odaka et al., 2000) to block cytoskeleton rearrangements and thus phagocytosis. Cells were also fixed with paraformaldehyde (PFA) to prevent phagocytosis.

Moreover, the toxicity of particles was evaluated using different parameters: Tumor necrosis factor (TNF)- α production (to assess the inflammatory response), lactate dehydrogenase (LDH) release (reflecting integrity of the cell membrane) and the production of total reactive oxygen species (ROS), especially H_2O_2 (Catelas et al., 1999; Donaldson et al., 2002; Bruch et al., 2004; Sayes et al., 2007). This part aimed at assessing whether the two types of beads (1 μm amine or 2 μm carboxylate) led to different levels of toxicity.

Following this methodology, we looked for a relationship between toxicity response and the level of phagocytosis determined by confocal microscopy and FCM analysis.

Material and methods

In vitro model

Macrophage cell culture

The RAW 264.7 cell line was provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem, LGC, Molsheim, France) and derives from mice peritoneal MA transformed by the abelson murine leukemia virus. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) complemented with 10% of fetal calf serum (Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (penicillin 10,000 units/ml, streptomycin 10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and incubated at 37°C under a 5% carbon dioxide humidified atmosphere.

Fluorescent polymer particles (beads)

- P beads: fluorescent polystyrene particles of 2 μm in diameter with carboxylate coating (Fluoresbrite® YGcarboxylate microspheres; Polyscience, Eppelheim, Germany). These particles have an excitation peak at 441 nm and an emission peak at 486 nm (green fluorescence) with a large spectrum.
- I beads: fluorescent polystyrene particles of 1 μm in diameter with amine coating (YGFluoSpheres®amine-modified microspheres; Invitrogen). These particles have an excitation peak at 505 nm, and an emission peak at 515 nm (green fluorescence).

Bead exposure conditions

For the two types of beads, an arbitrary ratio of 10 beads for one cell (10/1 ϵ) has been defined on the basis of the MA size comparatively to bead sizes.

Moreover, to work with similar surface area for the two types of beads, we used the ratio 40 I beads/1 ϵ (surface of P beads being four times more important than surface of I beads).

Actin inhibitors and blocking of phagocytosis

Three actin inhibitors were used: Cyt-D (Sigma), Lat (VWR, Fontenay sous bois, France) and Jasp (VWR). They were directly added to cell cultures and incubated at 37°C for 60 min, before addition of beads. These

molecules remained in the culture medium throughout all the experiments. The concentrations used (5 μ M Cyt-D, 0.1 μ M Lat and 1 μ M Jasp) were defined depending on the literature data or preliminary assays.

To block completely the phagocytic process, cells were fixed in a 4% PFA solution (Sigma) for 10 min before adding P or I beads (Moon et al., 2007).

Confocal microscopy phagocytosis assay

Exposure conditions

Cells were grown in 6-well plates (1 million cells in 4 ml) containing coverslips, and beads were incubated for 16 h.

Actin cytoskeleton fluorescent labelling

After the particle exposure, the coverslips were fixed in wells with 4% PFA for 10 min (except for the cells already fixed). The wells were washed with phosphate buffered saline (PBS; VWR) to remove beads that did not adhere to the cell membrane or were not internalised. Then, actin cytoskeleton was labelled with AlexaFluor[®]594 phalloidin (Invitrogen; diluted 1:40 in PBS) for 20 min and rinsed with PBS. Thereafter, cell nuclei were stained with 10 μ M of Hoechst 33342 solution (Sigma), during 15 min and rinsed with PBS.

Analysis

Microscopic analyses were performed on a confocal microscope TCS-SP2 AOBS (Leica[®], Heidelberg, Germany). Images were obtained from the fluorescence emitted by the beads (ex: 488 nm; em: 499–540 nm), AlexaFluor[®]594 phalloidin (ex: 543 nm; em: 615–693 nm) and Hoechst (ex: 350 nm; em: 408–443 nm). Confocal microscopy allowed making stacks of images. Indeed, for a given area of analysis, it was possible to acquire images in different planes of the Z axis (depth of field), to obtain a series of images to achieve XY projections and XZ and YZ section stacks of the selected area of interest.

Quantification of phagocytosis by FCM

FCM exposure conditions and TB quenching

Cells were prepared in 25 cm² culture flasks (2 millions cells in 4 ml). A control flask without particles was used to assess the autofluorescence of cells. Some flasks were directly exposed to beads, others were pretreated with actin inhibitors or PFA before adding P or I beads.

After 90 min or 24 h of exposure, culture medium was removed, cells were harvested with a scraper and aliquots containing 500,000 cells were centrifuged (10 min, 1500g). Cells were resuspended either in 500 μ l of DMEM or in 250 μ l of DMEM + 250 μ l of TB (0.4%, Sigma).

Cytotoxicity was also assessed by adding 1 mg/ml of propidium iodide (Sigma) in the tubes without TB (Jacobs and Pipho, 1983; Steinkamp et al., 2000; Riccardi and Nicoletti, 2006). This evaluation allows to quantify the percentage of dead cells. An exclusion window was made on propidium iodide negative cells to analyse only living cells and quantify the dynamic process of phagocytosis.

Cytometric analysis

Each condition was analysed twice on 10,000 cells. Acquisitions and analyses were performed using a cytometer analyser-cell-sorter FACS Diva[™] (BD Biosciences, San Jose, CA) equipped with the software Cell Quest[™] Pro.

The fluorochromes used were excited through an Enterprise II Argon Laser (wavelength set at 488 nm). The fluorescence emitted by P or I beads after excitation at 488 nm was collected through a band-pass filter 530/30 nm (FL1 channel), and the fluorescence emitted by excitation of propidium iodide at 488 nm was collected through a band-pass filter 695/40 nm (FL3 channel). For each acquisition, the size level of detection corresponding to the forward scatter was set above the size of cellular debris to detect only well-preserved cells.

Three FCM parameters were quantified for each sample:

- the average SSC, morphological parameter reflecting granularity and intracellular complexity, in relation to the presence of both adherent and phagocytosed beads, and quantified by the geometric mean (Y Geo Mean).
- the total Mean Fluorescence Intensity (MFI) corresponding to the total fluorescence emitted by the P or I beads (internalised and adhered), which we called total MFI. These values were obtained for the condition without TB on FL1 channel.
- the percentage of cells with internalised P or I beads that we called 'percentage of phagocytic cells' detected on the FL3 channel after TB quenching.

Toxicity assessment

For each experiment, cells were prepared in 96-well plates (100,000 cells/well for TNF- α and LDH assays, and 300,000 cells/well for ROS and H₂O₂ parameters) in 25 μ l of complete DMEM. Suspensions of beads in a volume of 75 μ l of DMEM were added to the culture and incubated for 90 min or 24 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

TNF- α production

After incubation with beads, released TNF- α was assessed in the supernatant using a commercial ELISA Kit (Quantikine[®] Mouse TNF- α Immunoassay; R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. The optical density of each well was determined using a microplate reader (Multiskan RC; Thermolabsystems, Helsinki, Finland) set to 450 nm. A standard curve was established, and results were expressed in picograms per milliliter of TNF- α .

LDH release

The activity of the LDH released from cells with damaged membranes was assessed using the CytoTox-ONE[™] Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, Charbonnières les bains, France) according to the manufacturer's instructions. Detection was performed on a fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems), using excitation/emission wavelengths at 530/590 nm. The activity

of the released LDH was reported to that of total cellular LDH (measured after control cells lysis) and was expressed as a percent of the control.

Oxydative stress

Total ROS: a large array of ROS activity can be assessed with the OxiSelect™ ROS Assay Kit (Euromedex, Mundolsheim, France). The assay uses the conversion of a nonfluorescent substrate, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate that can easily diffuse through cell membranes into a fluorogenic molecule 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF), which is highly fluorescent and proportional to total ROS level. DCF production was detected using a Fluoroskan Ascent fluorometer (Thermolabsystems) using excitation and emission wavelengths of 480 and 530 nm, respectively, and expressed as nanometer per hour.

Specific hydrogen peroxide (H_2O_2): after incubation, the cells were stimulated to release the hydrogen peroxide produced by addition of 100 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (Sigma). The release of H_2O_2 was measured as described by De la Harpe and Nathan (1985). Briefly, Krebs-Ringer phosphate glucose (KRPBG) buffer containing a mixture of scopoletin (30 μ M), NaN_3 (1 mM), and horseradish peroxidase (1 unit pupurogallin/ml HPO) was added to the cells. The horseradish peroxidase catalyzed the oxidation of the fluorescent scopoletin, which was measured over a period of 90 min (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems) using

excitation/emission wavelengths at 355/460 nm. Results are given as arbitrary units of the fluorescence.

Statistical analysis

Analysis and graphics were performed on Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Significance was established with ANOVA test ($P < 0.05$).

Results

Confocal microscopy phagocytosis assay

We first verified that the beads were internalised using confocal microscopy imaging (Figure 1). Figure 1A and 1B confirms that the phalloidin labelling was highly efficient to label actin cytoskeleton (red), beads were easily viewable (green) and Hoechst specifically labelled the nuclei (blue).

Thanks to the XZ and YZ sections of confocal stacks illustrated in Figure 1 (C-a) and (D-a), we demonstrated that beads were internalised beyond question. Indeed beads were surrounded by the phalloidin labelling of actin. On the contrary in Figure 1 (C-b) and (D-b), beads observed at the intersection of the white lines were just on the external side of the cell membrane showing the first step of internalization. Therefore, confocal microscopy allowed us to discriminate beads position (inside/outside).

The same types of results were seen with I beads (data not shown).

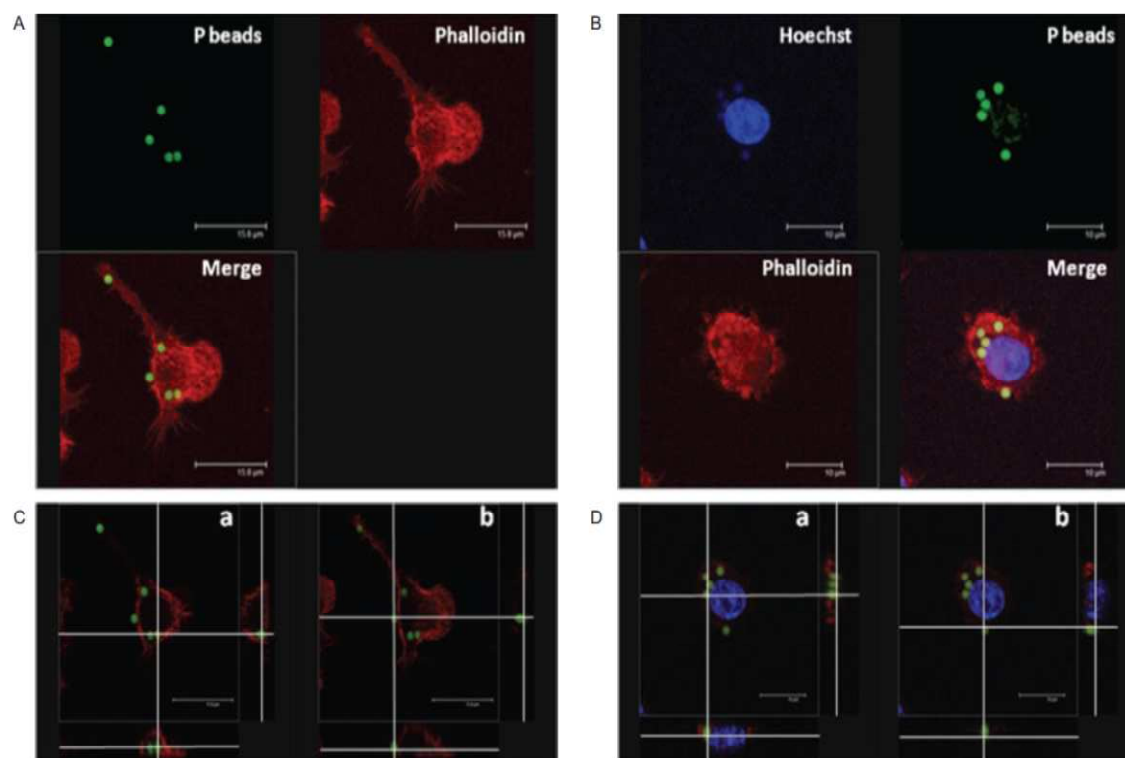


Figure 1. Confocal microscopy images of MA incubated with beads (10/1 ratio) for 16 h. (A-B) XY projection stack mean of the interest area with phalloidin and Hoechst-labelled MA in contact with P beads. (C-D) XZ and YZ section stacks with observed beads at the intersection of the white lines (a: bead inside, b: bead outside).

FCM phagocytosis quantification assay

The first parameter evaluated in FCM was the SSC reflecting morphological cellular complexity (Y Geo Mean). Figure 2 illustrates SSC cytograms (representative of three independent experiments) obtained for cells incubated alone or in presence of P or I beads. The SSC parameter dramatically increased for cells in contact with P beads (446 ± 7 vs. 140 ± 18 for cells alone) (Figure 2A), whereas it did not vary significantly for cells in contact with I beads (139 ± 12 vs. 140 ± 18). To verify that beads were internalised by phagocytosis, we used different inhibitors of this process (Cyt-D, Lat, Jasp) and studied the impact on the SSC parameter as shown by Figure 2B. For cells in contact with P beads, Cyt-D and Lat led to a discrete decrease in the SSC parameter (446 ± 7 vs. 245 ± 2 and 243 ± 2). In the presence of Jasp or PFA, the SSC parameter was significantly reduced (446 ± 7 vs. 64 ± 2 and 40 ± 2). The same types of results were seen for cells in contact with I beads, Jasp and PFA induced a decrease in the SSC parameter (139 ± 12 vs. 56 ± 2 and 38 ± 3 , respectively), although there was no effect on the SSC parameter with Cyt-D and Lat (139 ± 12 vs. 143 ± 1 and 127 ± 3).

In an attempt to quantify the phagocytic process, we adapted to our model an existing analysis using TB quenching to differentiate internalised beads from those just adhering to

the cell membrane surface. First, cells were incubated without TB and the total MFI, reporting the fluorescence emitted by both ingested and membrane-associated (not-yet-ingested) beads was measured. Free beads have been eliminated by washing steps and were not counted as part of the MFI values. MFI measured for I beads was significantly lower than that measured for P beads (390 ± 44 and 782 ± 63 , respectively) for the same ratio of beads (10/1 ϕ). MFI decreased significantly for P beads in presence of Cyt-D (782 ± 63 vs. 564 ± 56) but was still equivalent for I beads (352 ± 21). The MFI decreased sharply for both types of beads in presence of PFA (782 ± 63 vs. 75 ± 5 and 390 ± 44 vs. 96 ± 5). For the analysis with TB, the percentage of phagocytic cells was more important after incubation with P beads than with I beads ($49 \pm 11\%$ and $18 \pm 5\%$ of phagocytic cells, respectively). Treatment with Cyt-D resulted in a decrease in the percentage of phagocytic cells ($16 \pm 3\%$ vs. $49 \pm 11\%$ for P beads and $10 \pm 1\%$ vs. $18 \pm 5\%$ for I beads). According to these data ranges, Figure 3 illustrates the results of one among the four independent experiments. Figure 3A shows results without TB (total MFI) and Figure 3B presents values after TB quenching.

The effect of these inhibitors and that of Lat and Jasp are summarised in Figure 4. For P beads, Cyt-D and Jasp induced a decrease in the percentage of phagocytic cells close to 50%,

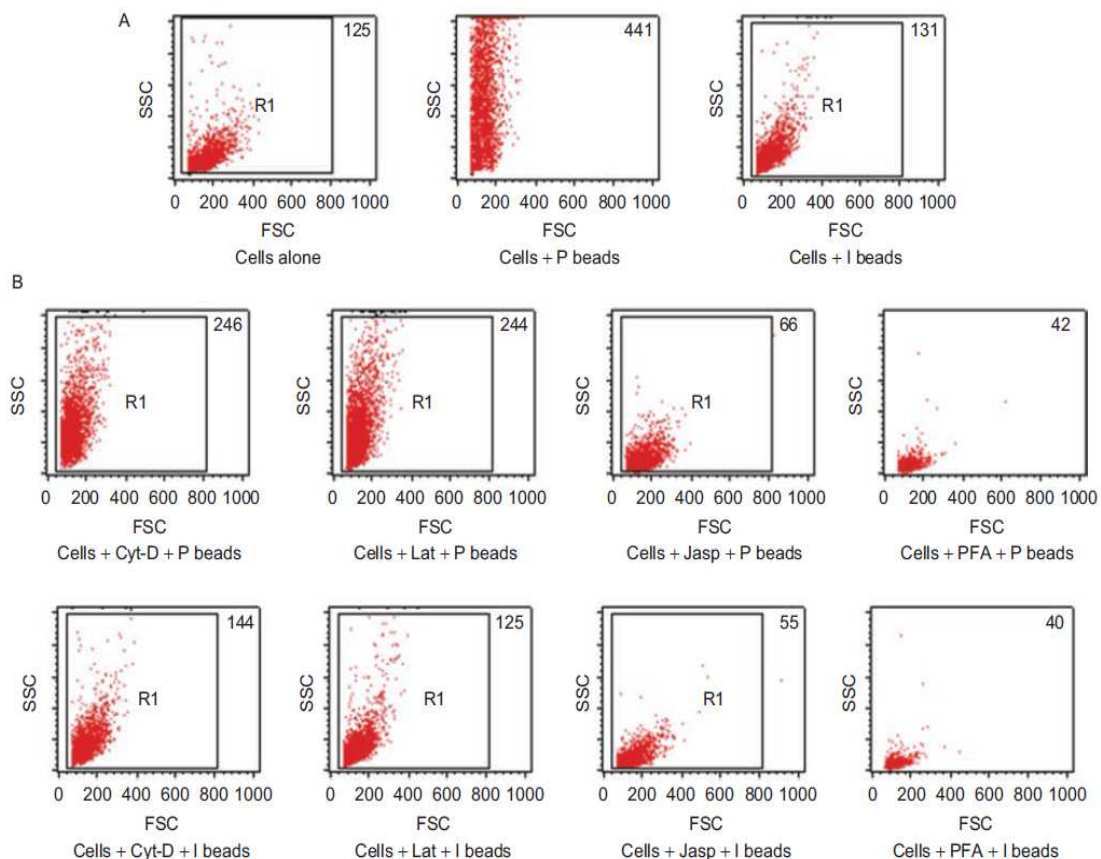


Figure 2. SSC parameter analysed for MA alone or after a 90-min incubation with P or I beads (10/1 ϕ ratio) (A), and in the presence of inhibitors of phagocytosis (Cyt-D, Lat and Jasp) or after PFA fixation (B). The value indicated on each cytogram corresponds to the Y Geo Mean which represents cellular complexity (representative of three independent experiments).

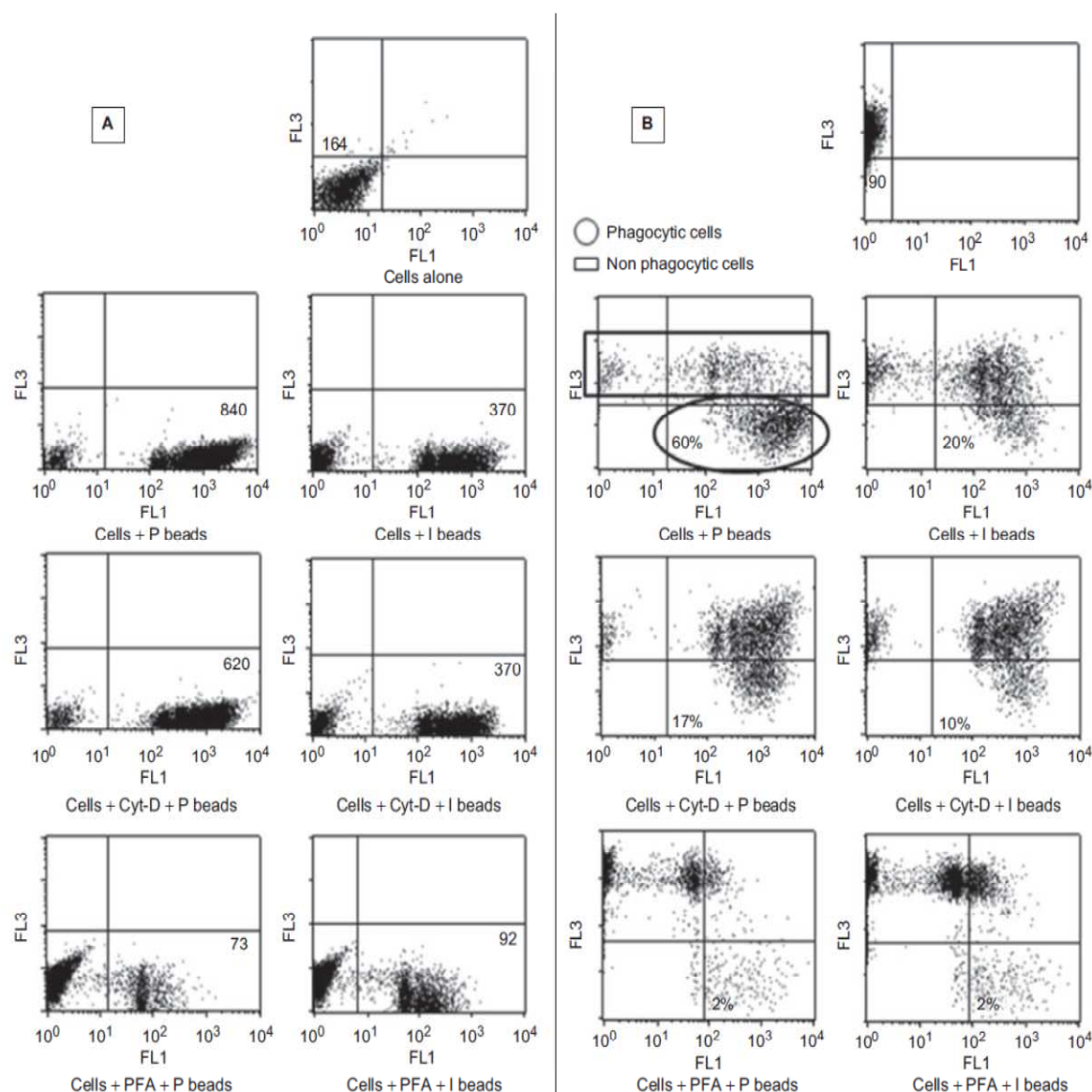


Figure 3. FCM analysis of cells without (A) or with trypan blue (B) after a 90-min incubation with P and I beads (10/1 ratio) in the presence or absence of Cyt-D and PFA. (A) Total MFI is represented on the FL1 channel (green fluorescence of all beads). (B) FL1 channel detects the green fluorescence of beads internalised by MA. After TB quenching non internalised beads emit a red fluorescence that can be detected on the FL3 channel allowing to distinguish phagocytic (FL1+/FL3-) from non phagocytic (FL3+) cells (illustration representative of four independent experiments).

whereas Lat seemed to have no impact. For I beads, all inhibitors seemed to have no effects. Finally, whatever the beads used, a PFA fixation significantly reduced the percentage of phagocytic cells $< 2 \pm 0.6\%$ ($P < 0.0001$) (Figure 3B).

Moreover, we verified that the inhibitors (Cyt-D, Lat and Jasp) were not toxic at the concentrations used: the amount of dead cells determined by propidium iodide incorporation was found between 8 and 15% (data not shown). Therefore, these inhibitors did not seem to be cytotoxic under these experimental conditions.

Toxicity assessment

The four toxicological parameters evaluated in this study are presented in Figure 5.

Figure 5A clearly shows that the only significant variation in $\text{TNF-}\alpha$ concentration was observed when P beads were incubated for 24 h with MA. There was no effect when cells were incubated with I beads, neither for 90 min nor for 24 h, even for the 40 I beads for one cell ratio. These data could be correlated with the quantification of phagocytosis summarised in Table 1. P beads were more phagocytosed after 24 h of incubation (74 ± 5 vs. 49 ± 11) and globally more phagocytosed than I beads (18 ± 5 or 45 ± 6). I beads at a 40/1 ratio for 24 h were as phagocytosed as P beads at a 10/1 ratio after a 24-h contact.

No effect was observed concerning the percentage of released LDH showed in Figure 5B. All values were at the same level than the negative control cells alone compared

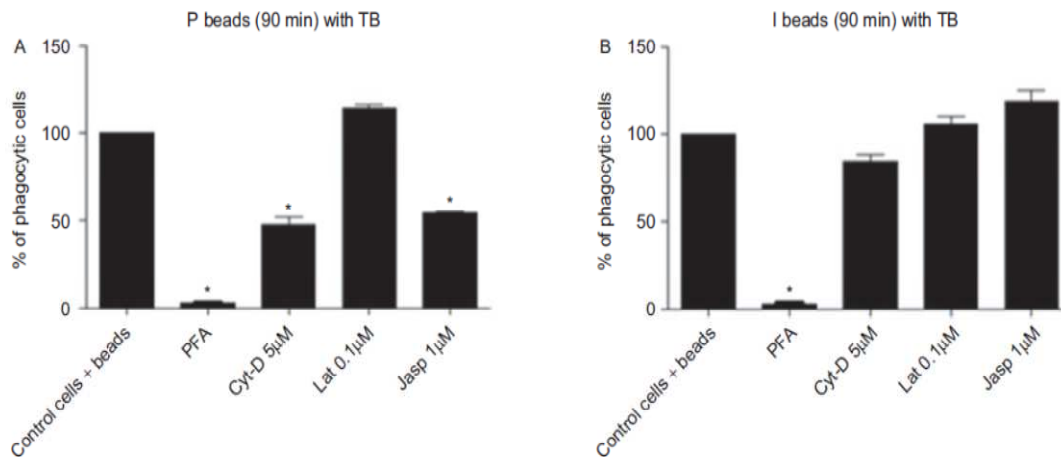


Figure 4. Effects of inhibitors of phagocytosis (Cyt-D, Lat and Jasp) and PFA fixation on the MA in contact with P or I beads (10/1 ratio) analysed in FCM after 90 min of exposure. The percentage of phagocytic cells is normalised with the control ($n=4$, $*P<0.0001$).

with the positive control (lysed cells), which was significantly different.

The DCF production (nM/h) reflecting the amount of global ROS generated (Figure 5C) indicates a significant enhancement after a 24-h incubation for the two types of beads. Correlated with Table 1, these data indicate that ROS generation is linked to the amount of phagocytosis and incubation time (24 h).

Finally, H_2O_2 production did not show significant differences among the different conditions of exposure (Figure 5D). After a 24-h exposure, ROS are generated probably due to H_2O_2 that are likely the source of other organoperoxides or lead to formation of hydroxides (Figure 5C).

Discussion

This study aimed at observing and quantifying phagocytosis using confocal microscopy coupled to FCM. Using these approaches, we were able to distinguish entirely engulfed fluorescent microsized particles from those just adhering to the cell membrane and FCM appeared as a powerful tool to perform a multiparametric analysis of this cellular process.

Confocal microscopic experiments were very useful to visualise bead internalization. This complementary approach confirms the efficiency of the actin labelling with phalloidin, which leads to a precise localization of beads throughout cells. A limit to this technique is that we could not quantify beads on images. Image analysing techniques could be adapted to this type of acquisition, but the area analysed would be limited. Another technique allowing to quantify the physical process of internalization is necessary. This is the reason why we developed FCM in this study.

The multiparametric FCM approach we developed was shown to be a powerful tool for the quantification of phagocytosis. This technique allows to analyse an important number of cells without requiring the physical observation of events. Different steps have been necessary to validate this approach especially the use of different phagocytosis inhibitors. FCM also confirmed the effectiveness of the 'TB quenching' for

quantifying phagocytosis. The results obtained after TB quenching are in good agreement with the dynamics of the phagocytic process and validated the use of TB quenching for quantification in FCM. We have jointly observed that green fluorescence shut down by TB was detected on the FL3 channel (red fluorescence). Indeed, the TB was excited at 488 nm and emitted in the red spectrum. This red fluorescence quenching could be allowed by a process similar to fluorescence resonance energy transfer (He et al., 2004; Haas 2005).

SSC parameter reflects cellular complexity not only inside cells but also at the membrane surface, it seems to be a good indicator of cellular dynamics during the process of bead internalization. SSC values increased with the amount of internalised beads (P beads). Moreover, we observed SSC changes after treating cells with actin inhibitors used as controls.

This FCM technique allowed us to observe significant differences between the two types of beads whose size and coating were different (P beads had a diameter of 2 µm and carboxylate surface groups whereas I beads had a diameter of 1 µm and amine surface groups). We observed that with P beads the SSC parameter was strongly increased compared with control cells, we quantified 60% of phagocytic cells and the effect of actin inhibitors was important. This suggests that P beads are highly phagocytosed, much more than a same ratio of I beads (10/1) for which SSC values were equivalent to that of the control cells, only 20% of phagocytic cells were observed and for which the inhibitors had no effect.

We have shown that Cyt-D, Jasp and Lat did not completely block the internalization of the beads (inhibition of the phagocytosis of P beads up to 50% and no effect on I beads), suggesting that other internalization pathways may be involved and particularly a nonactin-driven process (Aderem and Underhill, 1999; Castellano et al., 2001; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Niedergang and Chavrier 2004, 2005; Haberzettl et al., 2007; Lanzetti 2007; Yeung and Grinstein, 2007; Gratton et al., 2008). It would be interesting to explore other pathways such as energy-dependent

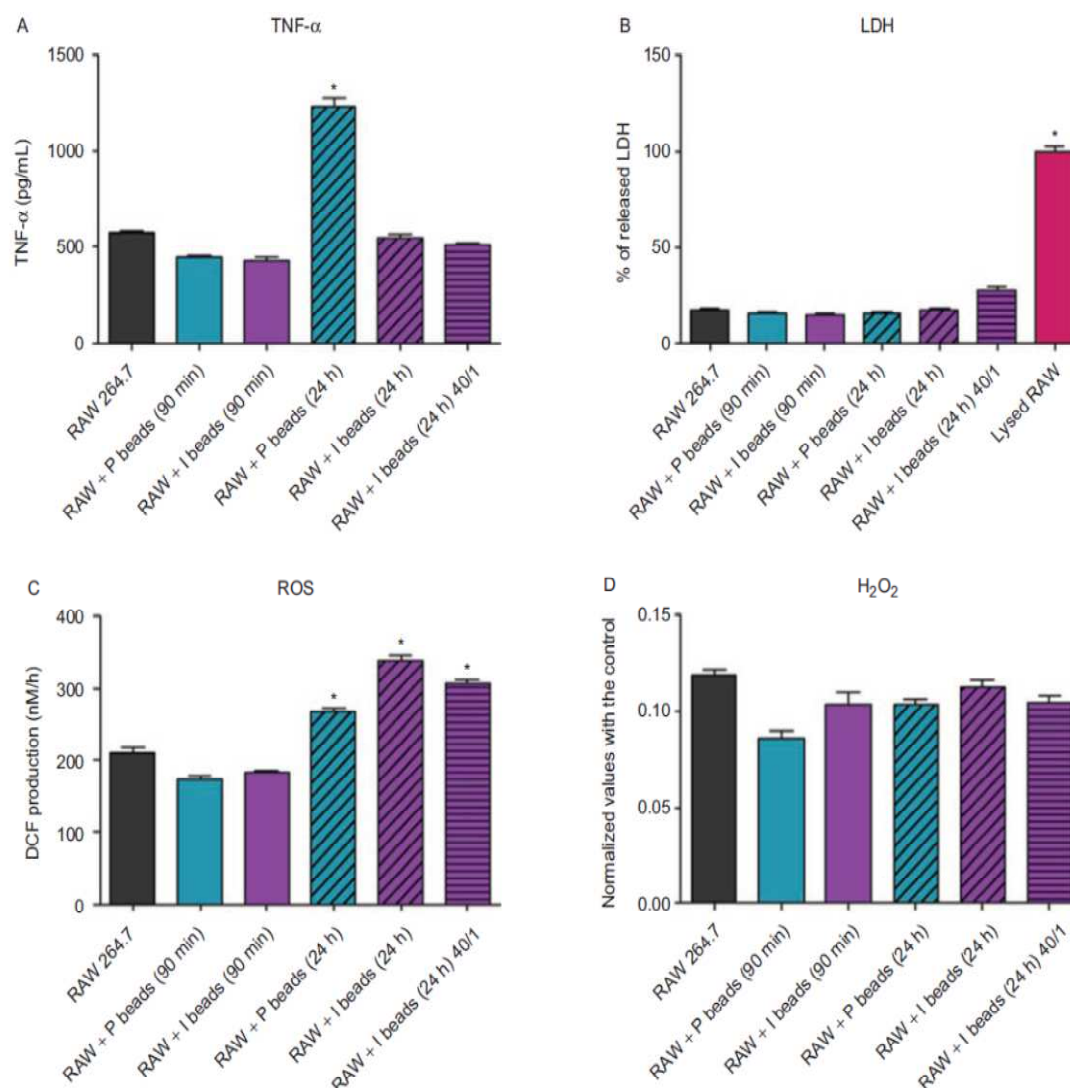


Figure 5. Toxicity assessment for the different conditions: 10/1 ϵ ratio for P and I beads (after 90 min or 24-h contact with RAW 264.7 cells) and 40/1 ϵ ratio for I beads (after 24-h contact) in terms of inflammation assessed by TNF- α production (pg/ml) (A), cell damage measured by the amount of LDH released (B), total ROS (C) and H₂O₂-specific production (D) ($n=3$, * $P<0.0001$).

Table 1. Summary data of quantification parameters obtained in FCM (SSC, total MFI and percentage of phagocytic cells) for the different exposure conditions: 10/1 ϵ ratio for P and I beads after a 90 min or 24-h contacts with RAW 264.7 cells and 40/1 ϵ ratio for I beads after a 24-h contact.

	P bead incubation		I bead incubation		
	10/1 ϵ		10/1 ϵ		40/1 ϵ
	90 min	24 h	90 min	24 h	24 h
SSC	446 \pm 7	649 \pm 21	139 \pm 12	192 \pm 19	183 \pm 32
Total MFI	782 \pm 63	828 \pm 75	390 \pm 44	508 \pm 91	831 \pm 48
% of phagocytic cells	49 \pm 11	74 \pm 5	18 \pm 5	45 \pm 6	76 \pm 6

phagocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis or macropinocytosis (Gratton et al., 2008). Finally, the study of membrane receptors such as the scavenger receptors MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) and the complement receptor 3 implicated in these pathways could also bring further information (May et al., 2000; Palecanda and Kobzik 2001;

Arredouani et al., 2004, 2005; Hamilton et al., 2006; Kanno et al., 2007; Groves et al., 2008; Sulahian et al., 2008).

Taken together, these results underline the importance of the physicochemical properties of the particles for the phagocytic process (size and surface groups) (Ahsan et al., 2002). Further investigations are needed to determine whether these two parameters have the same influence or if one prevails and

which one (using beads of different size with the same surface groups or conversely beads of same size but carrying different surface groups such as carboxylate, amine and polyethylene glycol).

Similarly, these characteristics could have a major impact on the biological toxicity. Toxicological evaluations show that in a global manner, ROS and LDH productions do not depend on the size and chemical composition of beads. Generation of global ROS seems more dependent on time incubation and amount of internalised beads. On the contrary, these parameters play a significant role in TNF- α inflammatory response: carboxylate 2 μ m beads (P beads) dramatically increase TNF- α production (Wilson et al., 2007), whereas amine 1 μ m beads (I beads) seem to have no impact (10/1 ϵ and 40/1 ϵ ratio). These results fit adequately since we demonstrated that P beads were more phagocytosed than I beads (10/1 ϵ ratio) but as much phagocytosed as I beads for a 40/1 ϵ ratio reflecting equivalence in surface area. Thus, relationship between surface chemistry and TNF- α production is clear.

Conclusion

We established a multiparametric method of analysis of phagocytosis coupling FCM to confocal microscopy. This approach allowed to highlight that physicochemical characteristics of beads (size, surface area and surface coating) were key factors of the internalization process and that they also have an impact on toxicity.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest.

References

- ▶ Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593–623.
- ▶ Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, Torres Suarez AI. 2002. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers-liposomes and microspheres-on the phagocytosis by macrophages. *J Control Release* 79:29–40.
- ▶ Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, Kobzik L. 2004. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med* 200: 267–272.
- ▶ Arredouani MS, Palecanda A, Koziel H, Huang YC, Imrich A, Sulahian TH, Ning YY, Yang Z, Pikkarainen T, Sankala M, Vargas SO, Takeya M, Tryggvason K, Kobzik L. 2005. MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. *J Immunol* 175:6058–6064.
- ▶ Bruch J, Rehn S, Rehn B, Borm PJ, Fubini B. 2004. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health* 207:203–216.
- ▶ Castellano F, Chavrier P, Caron E. 2001. Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol* 13:347–355.
- ▶ Catelas I, Petit A, Marchand R, Zukor DJ, Yahia L, Huk OL. 1999. Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles in vitro. *J Bone Joint Surg Br* 81:516–521.
- ▶ Champion JA, Walker A, Mitragotri S. 2008. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res* 25:1815–1821.
- ▶ Clift MJ, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, Guy K, Stone V. 2008. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 232:418–427.
- ▶ De la Harpe J, Nathan CF. (1985). A semi-automated micro-assay for H2O2 release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Immunol Methods* 78:323–336.
- ▶ de Oliveira CA, Mantovani B. 1988. Latrunculin A is a potent inhibitor of phagocytosis by macrophages. *Life Sci* 43:1825–1830.
- ▶ DeFife KM, Jenney CR, Colton E, Anderson JM. 1999. Disruption of filamentous actin inhibits human macrophage fusion. *FASEB J* 13:823–832.
- ▶ Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V. 2002. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 15:213–220.
- ▶ Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629–635.
- ▶ Fenteany G, Glogauer M. 2004. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol* 11:15–24.
- ▶ Fubini B. 1998. Surface chemistry and quartz hazard. *Ann Occup Hyg* 42:521–530.
- ▶ Fubini B, Fenoglio I, Ceschino R, Ghiazza M, Martra G, Tomatis M, Borm P, Schins R, Bruch J. 2004. Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity *in vitro* and *in vivo*. *Int J Hyg Environ Health* 207:89–104.
- ▶ Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VI, Napier ME, DeSimone JM. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11613–11618.
- ▶ Groves F, Dart AE, Covarelli V, Caron E. 2008. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 65:1957–1976.
- ▶ Haas E. 2005. The study of protein folding and dynamics by determination of intramolecular distance distributions and their fluctuations using ensemble and single-molecule FRET measurements. *Chemphyschem* 6:858–870.
- ▶ Haberzettl P, Duffin R, Krämer U, Höhr D, Schins RP, Borm PJ, Albrecht C. 2007. Actin plays a crucial role in the phagocytosis and biological response to respirable quartz particles in macrophages. *Arch Toxicol* 81:459–470.
- ▶ Hamilton RF Jr, Thakur SA, Mayfair JK, Holian A. 2006. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *J Biol Chem* 281:34218–34226.
- ▶ Hasegawa T, Iijima K, Hirota K, Nakajima T, Makino K, Terada H. 2008. Exact determination of phagocytic activity of alveolar macrophages toward polymer microspheres by elimination of those attached to the macrophage membrane. *Colloids Surf B Biointerfaces* 63:209–216.
- ▶ He L, Wu X, Meylan F, Olson DP, Simone J, Hewgill D, Siegel R, Lipsky PE. 2004. Monitoring caspase activity in living cells using fluorescent proteins and flow cytometry. *Am J Pathol* 164:1901–1913.
- ▶ Hed J, Hallden G, Johansson SG, Larsson P. 1987. The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods* 101:119–125.
- ▶ Jacobs DB, Pipho C. 1983. Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells. *J Immunol Methods* 62:101–108.
- ▶ Jones BG, Dickinson PA, Gumbleton M, Kellaway IW. 2002. The inhibition of phagocytosis of respirable microspheres by alveolar and peritoneal macrophages. *Int J Pharm* 236:65–79.
- ▶ Kanno S, Furuyama A, Hirano S. 2007. A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. *Toxicol Sci* 97:398–406.
- ▶ Lanzetti L. 2007. Actin in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 19:453–458.
- ▶ May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM. 2000. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by Fc γ or CR3. *Nat Cell Biol* 2:246–248.
- ▶ Möller W, Hofer T, Ziesenis A, Karg E, Heyder J. 2002. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 182:197–207.
- ▶ Moon IS, Cho SJ, Jin I, Walikonis R. 2007. A simple method for combined fluorescence *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Mol Cells* 24:76–82.
- ▶ Niedergang F, Chavrier P. 2004. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome. *Curr Opin Cell Biol* 16:422–428.
- ▶ Niedergang F, Chavrier P. 2005. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol* 291:43–60.
- ▶ Nuutila J, Lilius EM. 2005. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A* 65:93–102.
- ▶ Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823–839.

- ▶ Odaka C, Sanders ML, Crews P. 2000. Jaspilakinolide induces apoptosis in various transformed cell lines by a caspase-3-like protease-dependent pathway. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:947-952.
- ▶ Oliveira CA, Chedraoui S, Mantovani B. 1997. Latrunculin A is a potent inducer of aggregation of polymorphonuclear leukocytes. *Life Sci* 61:603-609.
- ▶ Oliveira CA, Kashman Y, Mantovani B. 1996. Effects of latrunculin A on immunological phagocytosis and macrophage spreading-associated changes in the F-actin/G-actin content of the cells. *Chem Biol Interact* 100:141-153.
- ▶ Palecanda A, Kobzik L. 2001. Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. *Curr Mol Med* 1:589-595.
- ▶ Ravetch J, Aderem A. 2007. Phagocytic cells. *Immunol Rev* 219:5-7.
- ▶ Riccardi C, Nicoletti I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1:1458-1461.
- ▶ Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci* 97:163-180.
- ▶ Serda RE, Gu J, Burks JK, Ferrari K, Ferrari C, Ferrari M. 2009. Quantitative mechanics of endothelial phagocytosis of silicon microparticles. *Cytometry A* 75:752-760.
- ▶ Steinkamp JA, Valdez YE, Lehnert BE. 2000. Flow cytometric, phase-resolved fluorescence measurement of propidium iodide uptake in macrophages containing phagocytized fluorescent microspheres. *Cytometry* 39:45-55.
- ▶ Sulahian TH, Imrich A, Deloid G, Winkler AR, Kobzik L. 2008. Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry. *Respir Res* 9:59.
- ▶ Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Walter E. 2001. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release* 76:59-71.
- ▶ Van Amersfoort ES, Van Strijp JA. 1994. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry* 17:294-301.
- ▶ Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* 77:117-125.
- ▶ Wilson MR, Foucaud I, Barlow PG, Hutchison GR, Sales J, Simpson RJ, Stone V. 2007. Nanoparticle interactions with zinc and iron: implications for toxicology and inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 225:80-89.
- ▶ Yeung T, Grinstein S. 2007. Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol Rev* 219:17-36.

I.3 Données complémentaires

I.3.1 Observations microscopiques

Des images ont été réalisées en microscopie photonique après coloration par la méthode de MGG (*ANNEXE II*) ainsi qu'en microscopie électronique à balayage (MEB - *ANNEXE II.2.1*) pour des cellules en contact avec des billes P et I. La **Figure 42** présente uniquement les résultats obtenus pour les billes P. En effet, les billes I étant plus petites, les images étaient sensiblement équivalentes mais moins nettes.

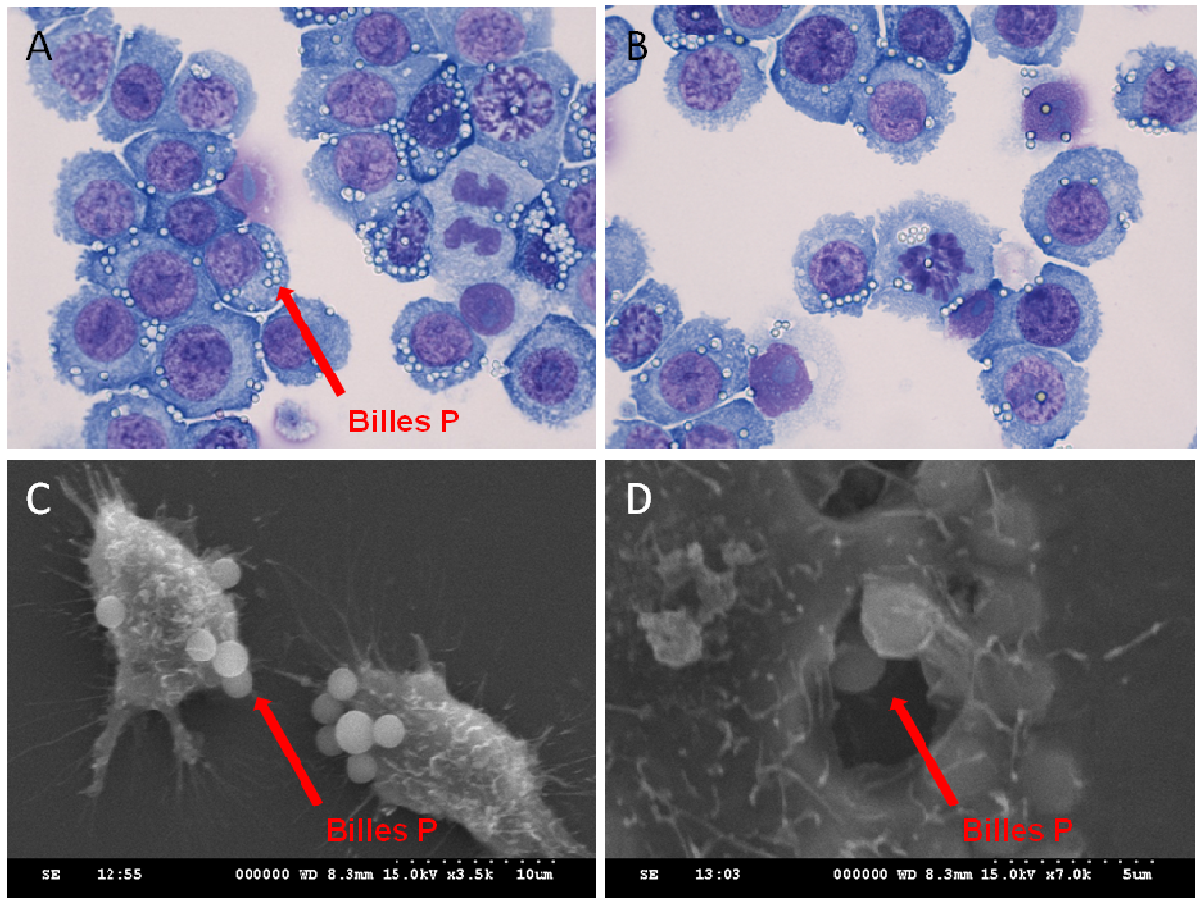


Figure 42 : Images réalisées en microscopie photonique après coloration cytologique par la méthode de MGG (A et B) (Objectif x60) et en microscopie électronique à balayage (C et D) sur des cellules de la lignée RAW 264.7 mises en contact avec des billes P (10/1 ϕ) après 6 heures d'incubation (A et B) ou après 16h d'incubation (C et D).

Les images en 2D ont confirmé l'impossibilité de distinguer clairement si les particules étaient à l'intérieur des cellules ou seulement adhérentes en surface (**Figure 42 A et B**). Ces approches microscopiques ont également permis l'observation des étapes d'adhésion et de formation d'invaginations membranaires qui sont le point de départ du processus de phagocytose, ainsi que dans certains cas d'observer des vésicules correspondant aux lysosomes autour de certaines billes et de certaines particules.

Les images de MEB sont venues confirmer l'étape d'adhésion des particules aux cellules en apportant des informations supplémentaires notamment sur la structure membranaire de la lignée RAW 264.7 apparaissant très hétérogène ce qui explique le profil morphologique variable de ces cellules (**Figure 42 C et D**). Nous avons aussi pu observer des vésicules de phagocytose en cours de formation correspondant à l'étape d'internalisation du processus de phagocytose (**Figure 42 D**).

Les particules micrométriques sont donc apparues comme un bon modèle pour étudier l'internalisation mettant en jeu vraisemblablement un processus majeur de phagocytose.

La réalisation de vidéo grâce à une plate-forme de vidéomicroscopie nous a permis d'observer bien distinctement les phénomènes de déplacement des macrophages et de réorganisations des points de contact focaux ainsi que la formation des pseudopodes (**Figure 43**).

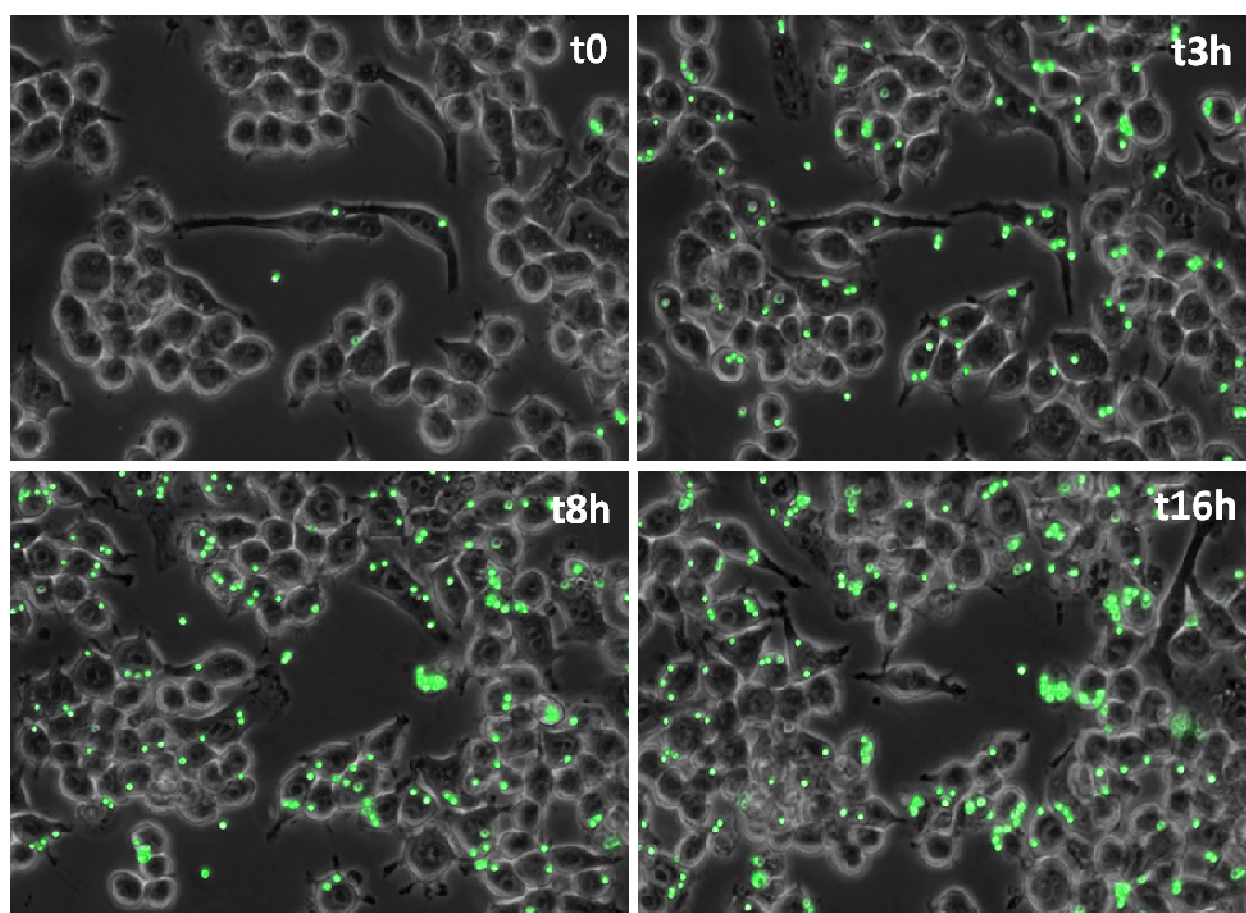


Figure 43 : Images obtenues lors de l'acquisition en vidéomicroscopie sur une durée de 16h de macrophages de la lignée RAW 264.7 mises en contact avec des billes P (10/1φ).

Les essais de vidéomicroscopie ont été réalisés avec des billes de polystyrène (billes P) de 2 μm de diamètre mises en contact avec les macrophages et filmés sur différentes périodes de temps (90 min, 3h et 16h). Il a été très enrichissant d'observer de façon dynamique les nombreux réarrangements se produisant au niveau de la membrane cellulaire du macrophage. Celle-ci est en effet hautement déformable et très active (formation/désassemblage des contacts focaux). Il a aussi été intéressant de constater qu'au cours du temps, les cellules semblaient se répartir les billes internalisées lors des divisions cellulaires, apprécié par un pourcentage plus faible de billes par cellules au cours du temps.

I.3.2 Les marquages cellulaires fluorescents

I.3.2.1 Marquage des membranes plasmiques

Les membranes cellulaires des macrophages ont été marquées dans un premier temps avec le PKH26 (Sigma) caractérisé par un maximum d'excitation à 551 nm et un maximum de réémission à 567 nm (fluorescence orange) (Hmama et al., 2004, Barreda et al., 2000). Cette sonde fluorescente s'insère dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires et permet leur visualisation générale. Pour ce marquage, deux concentrations de PKH26 ont été testées (1/200 et 1/100) ainsi que différents temps d'exposition au diluent C (30 secondes et 1 minute). Le diluent C était une solution aqueuse iso-osmotique utilisée pour maintenir la viabilité cellulaire en maximisant la solubilité de la sonde et ainsi augmenter l'efficacité du marquage. Le marquage au PKH26 précédait la mise en contact des cellules avec les billes puisque ce marquage était réalisé sur un culot de cellules avant sa remise en culture.

Nous avons observé que les billes P (et il en a été de même pour les billes I), réémettaient dans toutes les longueurs d'ondes y compris dans le rouge ce qui est un inconvénient majeur pour des études de colocalisation (*Figure 44 A*).

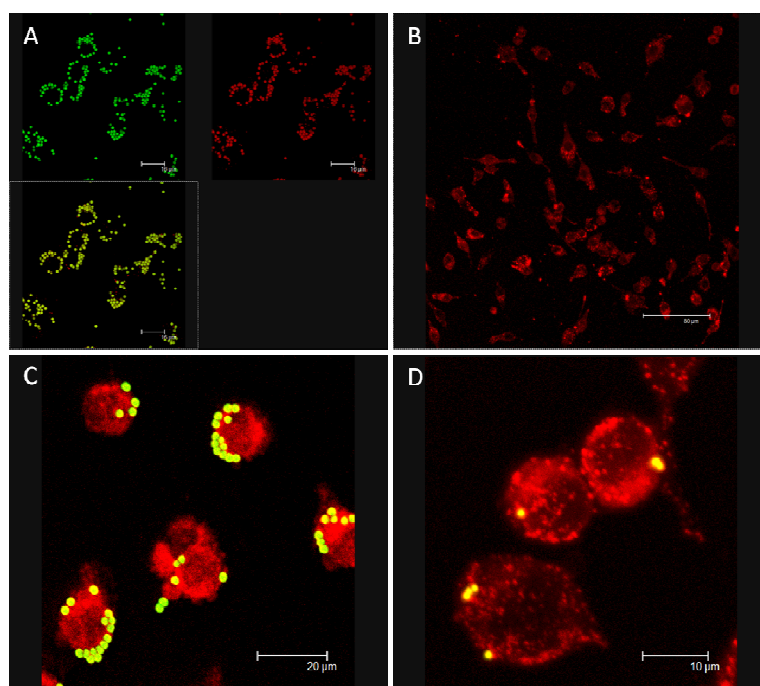


Figure 44 : Marquage PKH26 (dilution 1/100) sur des macrophages de la lignée RAW 264.7. (A) cellules marquées au PKH26 + billes P après 24h, (B) cellules marquées au PKH26 sans billes, (C) cellules marquées au PKH26 + billes P (10/1φ) après 24h, (D) cellules marquées au PKH26 + billes I (10/1φ) après 24h. Les images (C et D) correspondent à la projection maximale de la fluorescence obtenue pour une pile d'images de la zone sélectionnée.

La *Figure 44 B* correspond aux macrophages sans billes traités au PKH26. Cette condition nous a permis de vérifier l'homogénéité du marquage membranaire et sa qualité, se traduisant par une absence de bruit de fond. Il était aussi intéressant de confirmer que les noyaux des cellules (non marqués) étaient repérables sur l'image « en négatif ». La *Figure 44 C et D* correspond à la superposition des images fluorescentes obtenues pour des cellules marquées au PKH26 puis

incubées avec des billes P ou I. Les cellules étaient bien visibles (fluorescence orange due au marquage PKH26) et les billes apparaissaient en jaune. Si les billes ne réémettaient pas dans plusieurs spectres, cette fluorescence jaune aurait pu être expliquée par une colocalisation des billes au sein des membranes cellulaires. Pour le moment, seule la visualisation en 3D nous a permis de voir certaines billes réellement internalisées et d'autres plutôt adhérentes à la membrane.

Suite aux essais peu concluants avec le PKH26 (marquage très peu homogène), le cortex d'actine-F sous-membranaire a été marqué avec la sonde Alexa Fluor® 594 phalloïdine (Invitrogen) caractérisée par un maximum d'excitation à 581 nm et un maximum de réémission à 609 nm (fluorescence rouge). La phalloïdine est une phallotoxine isolée du champignon *Amanita phalloïdes* et correspond à un peptide qui se lie spécifiquement sur un site de l'actine-F. Pour ce marquage, une seule concentration a été testée (165 nM) pour une durée d'incubation fixée à 20 minutes. Le marquage à la phalloïdine était réalisé après la mise en contact entre les cellules et les billes car il nécessitait que les cellules soient fixées préalablement au PFA.

La **Figure 45 A** montre que contrairement au PKH26, la phalloïdine, bien qu'elle ne marque que le cytosquelette d'actine ou cortex sous-membranaire et non la membrane cellulaire, permet de distinguer de façon beaucoup plus précise les contours cellulaires. De plus, le marquage est beaucoup plus homogène, ce qui permet de travailler de façon plus détaillée sur chaque plan de la pile d'image acquise en microscopie confocale. De cette façon il est possible de travailler sur les projections de plans de coupes (**Figure 45 B et C**) et de déterminer plus précisément la position des billes. Il apparaît alors de façon plus évidente que dans la **Figure 45 B** la bille est localisée à l'extérieur de la cellule tandis que dans la **Figure 45 C**, la bille se trouve à l'intérieur de la cellule.

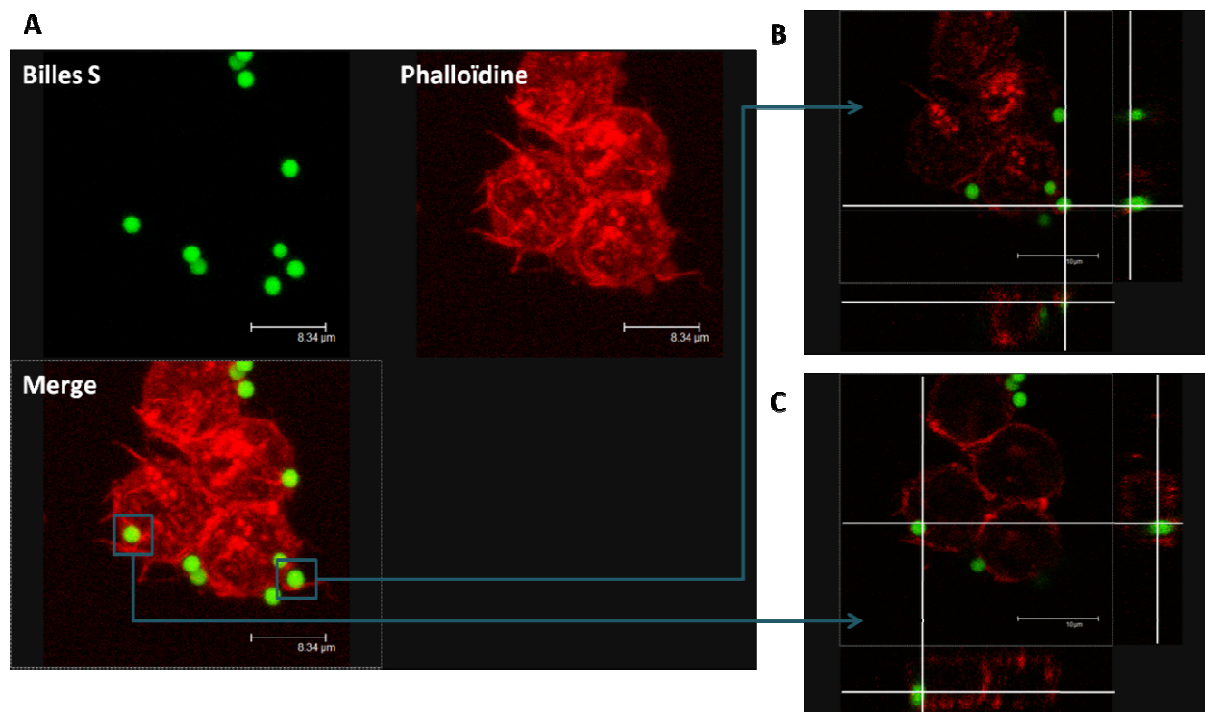


Figure 45 : Marquage du cortex d'actine sous-membranaire à la phalloïdine sur des macrophages de la lignée RAW 264.7 après 24h de contact avec des billes S (10/1φ). (A) Projection max de la pile d'images réalisées sur ce plan pour les billes (vert), la phalloïdine (rouge) et la superposition des deux. (B et C) correspondent à des projections de plans de coupe selon les axes XZ et YZ permettant l'évaluation de la position d'une bille particulière (située à l'intersection des lignes blanches).

I.3.2.2 Marquage des lysosomes au Lysotracker®

Les lysosomes, vésicules acides présentes dans le cytoplasme des macrophages ont été marqués avec le Lysotracker® Red DND 99 (Invitrogen) (Gonzalez et al., 2006, Coffey et al., 2005, Ibrahim-Granet et al., 2003) qui permet de marquer les lysosomes des cellules traitées en se basant sur leur acidité (maximum d'excitation à 577 nm et maximum de réémission à 590 nm ; fluorescence rouge), le but étant de vérifier la co-localisation des billes dans les lysosomes. En effet au cours du processus de phagocytose, les billes sont internalisées dans des vésicules dont le contenu s'acidifie. Pour ce marquage deux concentrations ont été testées (50 nM et 75 nM) ainsi que deux temps d'incubation : 45 minutes et 90 minutes. Le marquage avec le Lysotracker® pouvait être effectué avant ou après le contact entre les cellules et les billes car il était réalisé directement sur les cellules adhérentes au fond des puits sur les coverslips.

La **Figure 46 A** permettait de vérifier l'efficacité du marquage seul (sans billes). Il apparaissait dans nos cellules de petites vésicules rouges, vraisemblablement cytoplasmiques, correspondant aux lysosomes. La fluorescence est apparue assez faible dans son ensemble. Les images combinées du contact avec les billes P ou I et du marquage Lysotracker® n'étaient pas exploitables. En effet, les billes P et I réémettaient dans toutes les longueurs d'onde comme décrits dans le paragraphe précédent. Les images de la **Figure 46 B et C** montraient que la fluorescence émise par les billes se superposait à la fluorescence émise par le marquage Lysotracker®. Ainsi il n'y avait pas de distinction possible entre le marquage des lysosomes et les billes.

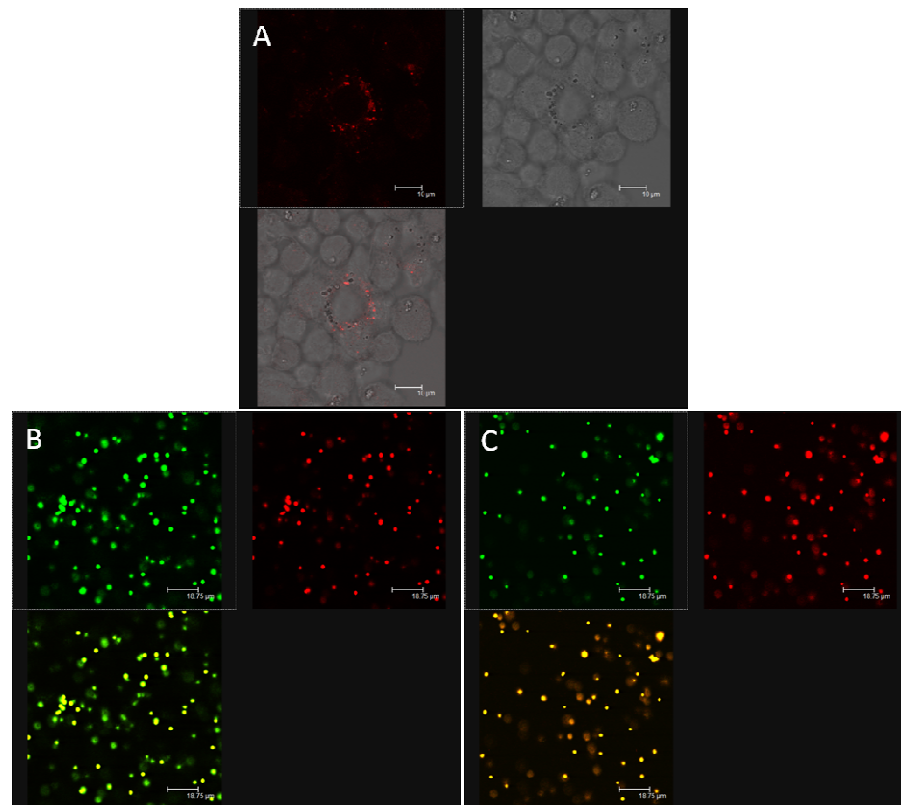


Figure 46 : Marquage au Lysotracker® Red DND-99 sur des macrophages de la lignée RAW 264.7. (A) marquage Lysotracker® seul (image de la fluorescence + image de contraste et superposition des deux), (B) cellules + billes P (10/1φ) 24h + marquage Lysotracker®, (C) cellules + billes I (50/1φ) 24h + marquage Lysotracker®. Les images (B et C) présentent les billes (fluorescence verte) et le marquage Lysotracker® (fluorescence rouge) ainsi qu'une superposition des deux images.

I.3.3 Evaluation de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux

Il existe une méthode très courante pour évaluer la viabilité cellulaire en CMF. Cette technique consiste à utiliser une solution d'iodure de propidium permettant de déduire le pourcentage de cellules mortes et effectuer des fenêtres d'exclusion pour ne travailler par la suite qu'avec des cellules vivantes (Riccardi and Nicoletti, 2006, Jacobs and Pipho, 1983).

Dans nos analyses, le pourcentage de cellules mortes (avec et sans billes) pour toutes les expériences réalisées en CMF a été en moyenne compris entre 10 et 20% maximum (Figure 47). L'ajout de billes P ou I aux cultures n'affectait pas significativement le pourcentage de cellules mortes (10% pour les billes P et 10.5% pour les billes I contre 9% pour les cellules seules). Ces résultats étant reproductibles entre les différentes expériences, nous en avons déduit que les deux types de billes n'étaient pas cytotoxiques dans les conditions expérimentales appliquées. Ces résultats ont été confirmés pour différents ratios billes/cellules (jusqu'à 100/1 ϕ), et différents temps d'incubation (jusqu'à 22h).

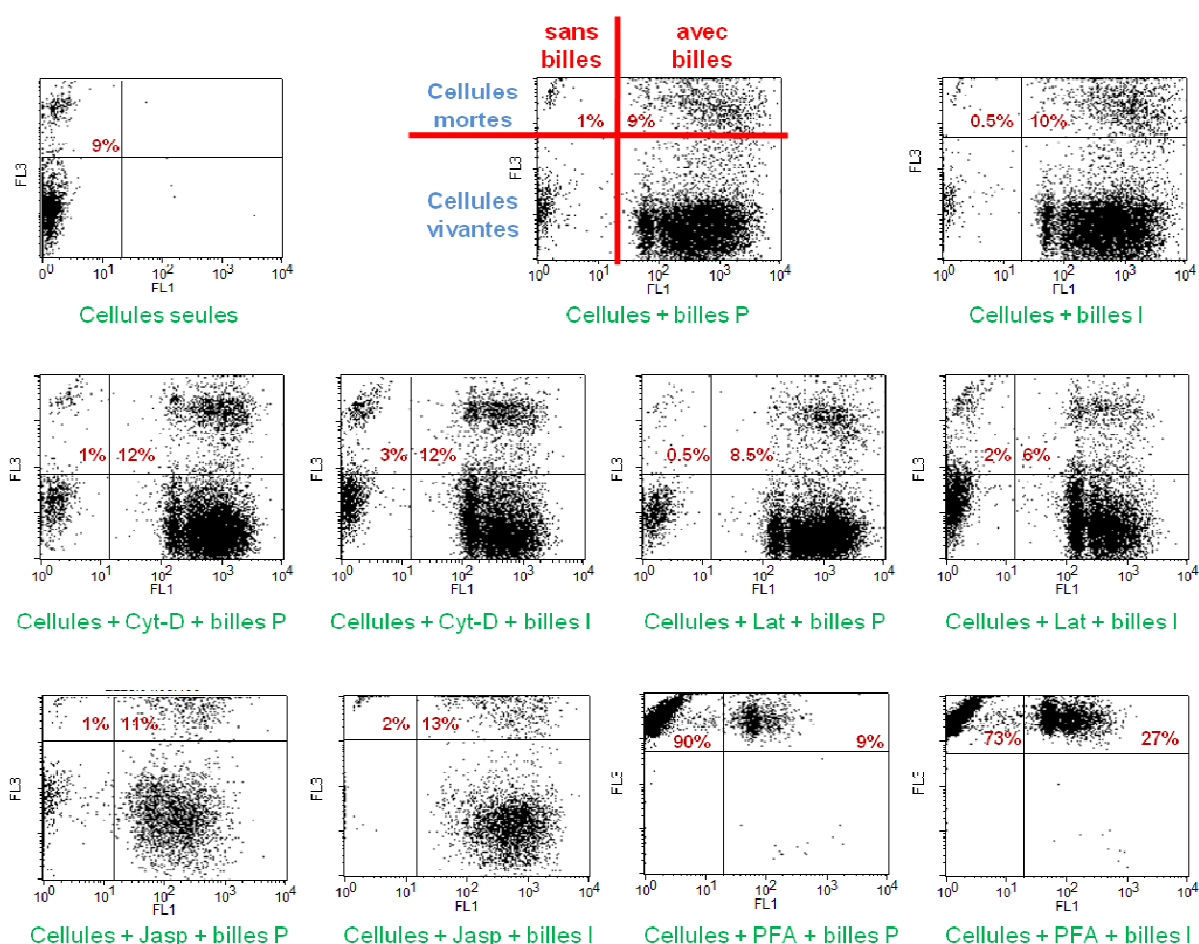


Figure 47 : Profil des cytogrammes obtenus lors de l'évaluation de la mortalité cellulaire grâce à l'utilisation d'iodure de propidium sur les macrophages de la lignée RAW 264.7 en CMF. Les cellules iodure de propidium positives se trouvent dans les quadrants supérieurs gauche et droit de chaque cytogramme. L'utilisation des deux canaux de fluorescence FL1 (Fluorescence vertes – billes) et FL3 (Fluorescence rouge – iodure de propidium) simultanément permet de faire la distinction entre les cellules mortes sans billes (en haut à gauche sur les cytogrammes) et les cellules mortes avec billes (en haut à droite sur les cytogrammes) exprimées en pourcentages.

Les trois inhibiteurs des filaments d'actine utilisés (Cyt-D, Lat et Jasp) ont engendré des pourcentages de cellules mortes compris entre 8% et 15% et s'avéraient donc non cytotoxiques dans les conditions expérimentales employées. En revanche, plusieurs durées d'incubation avec la Cyt-D ont révélé que le pourcentage de cellules mortes augmentait de façon significative après 2h30 d'incubation (environ 40% de cellules positives à l'iodure de propidium). Nous avons donc fixé un temps d'exposition limite de 60 minutes à la Cyt-D pour la suite des expériences.

Enfin pour le témoin PFA qui est un perméabilisant total, la mortalité cellulaire était proche de 100%.

I.3.4 Étude dynamique du processus de phagocytose

I.3.4.1 Effet du ratio de microparticules par cellule

Nous avons par la suite, regardé l'effet du ratio de microparticules employé afin de mieux appréhender le phénomène d'internalisation par les macrophages. Dans ce cas la durée d'incubation entre les billes et les macrophages était fixée arbitrairement à 90 minutes.

- Pour les billes P trois ratios ont été testés : 10 billes pour une cellule (10/1 ϕ), 20 billes pour une cellule (20/1 ϕ) et 30 billes pour une cellule (30/1 ϕ).
- Pour les billes I cinq ratios ont été testés : 10 billes pour une cellule (10/1 ϕ), 20 billes pour une cellule (20/1 ϕ), 30 billes pour une cellule (30/1 ϕ), 50 billes pour une cellule (50/1 ϕ) et 100 billes pour une cellule (100/1 ϕ).

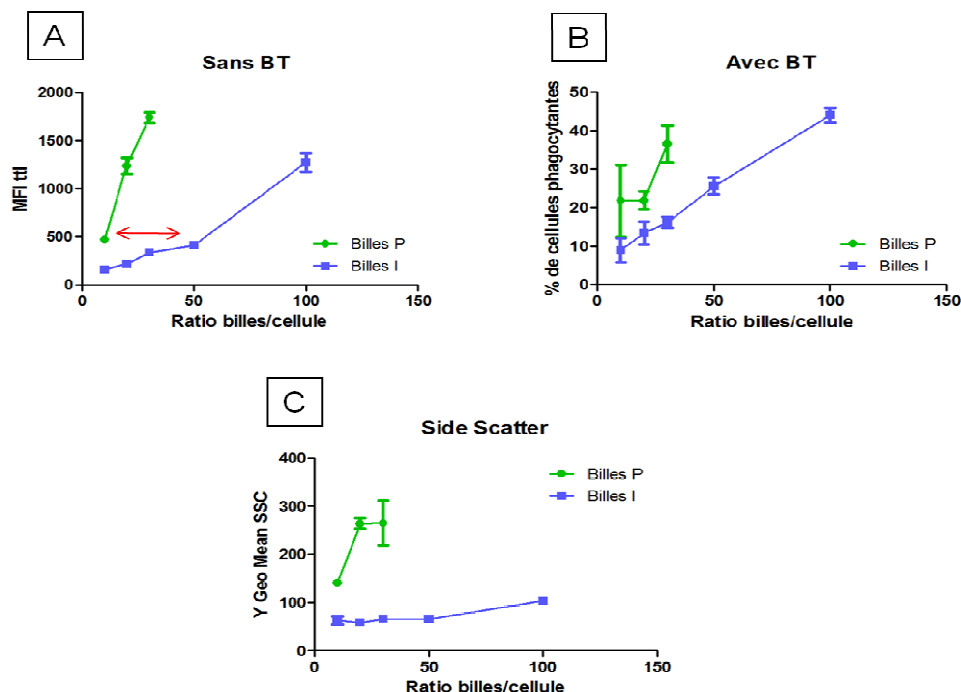


Figure 48 : Graphiques relatifs à l'effet du ratio nombre de billes (P ou I) pour une cellule sur les macrophages de la lignée RAW 264.7. (A) MFI totale (sans BT), (B) pourcentage de cellules phagocytantes (avec BT), (C) Side scatter (Y Geo Mean). La durée de contact entre les billes et les cellules était fixée à 90 minutes. Trois ratios de billes P (10/1 ϕ , 20/1 ϕ et 30/1 ϕ) ainsi que cinq ratios de billes I (10/1 ϕ , 20/1 ϕ , 30/1 ϕ , 50/1 ϕ et 100/1 ϕ) ont été testés (n=4).

La MFI pour les deux types de billes augmentait de façon linéaire en fonction du ratio croissant de billes administrées. De plus l'étude de ce paramètre montrait une équivalence entre les billes P 10/1 ϕ et les billes I 50/1 ϕ (flèche rouge). A ratio équivalent, les billes P présentaient une MFI plus importante (**Figure 48 A**). Le pourcentage de cellules phagocytantes augmentait en fonction de la quantité de billes administrées. De plus, le processus de phagocytose était plus important avec les billes P à ratio équivalent (**Figure 48 B**). Ces données sont en accord avec le paramètre de SSC qui reflète la complexité cellulaire (**Figure 48C**).

I.3.4.2 Effet du temps de contact entre les microparticules et les macrophages

De même que pour l'effet du ratio, différents temps d'incubation entre les cellules et les billes ont été évalués en CMF (2 heures, 4 heures, 6 heures, 8 heures et 22 heures). De façon à obtenir un pourcentage de cellules phagocytantes comparable, nous avons utilisé un ratio de 10/1 ϕ pour les billes P et un ratio de 50/1 ϕ pour les billes I.

La MFI augmente pour les deux types de billes mais de façon moins régulière pour les billes P au cours du temps (**Figure 49 A**).

Le pourcentage de cellules phagocytantes augmente de façon équivalente pour les deux types de billes au cours du temps et certainement jusqu'à un plateau (**Figure 49 B**). Cette fois-ci les billes I apparaissent plus phagocytées mais leur ratio était cinq fois supérieur à celui des billes P.

Les résultats sont similaires au regard du paramètre de SSC mesuré à chacun des temps d'incubation indiqués, mais les valeurs obtenues pour les billes P étaient supérieures à celles obtenues pour les billes I (**Figure 49 C**).

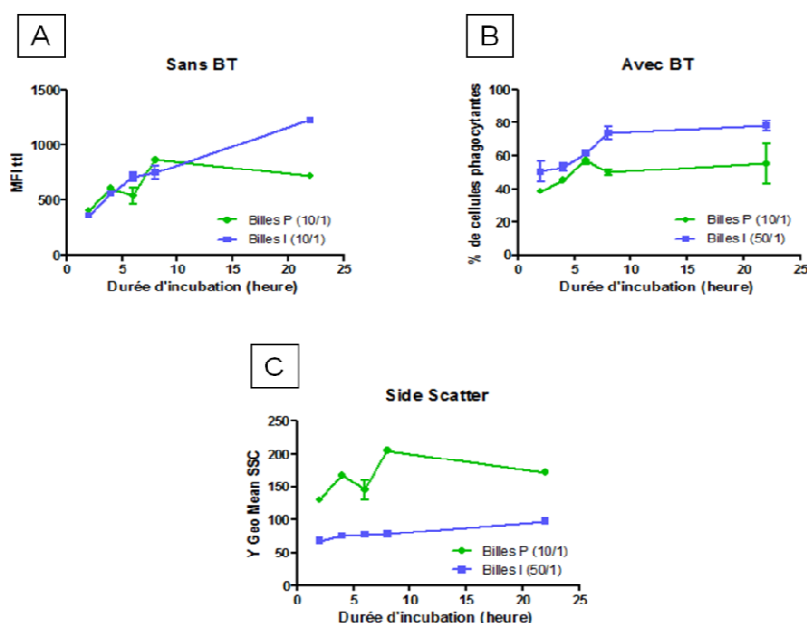


Figure 49 : Graphiques relatifs à l'effet de la durée d'incubation des billes P et I avec les macrophages de la lignée RAW 264.7. (A) MFI totale (sans BT), (B) pourcentage de cellules phagocytantes (avec BT), (C) Side scatter (Y Geo Mean). Les billes P à 10/1 ϕ et les billes I à 50/1 ϕ ont été incubées 2h, 4h, 6h, 8h et 22h.

Les analyses effectuées avec des ratios différents et des durées d'incubation différentes ont permis de souligner l'importance de la variabilité des résultats engendrée par la modification de ces paramètres. Il est apparu indispensable de fixer ces paramètres de façon à obtenir des résultats reproductibles. Ainsi pour la suite de l'étude, la durée d'incubation macrophage/particules a été fixée à 24 heures et le ratio a aussi été fixé en termes de nombre de particules par cellule.

I.4 Bilan sur l'internalisation de particules micrométriques

Au vu des données obtenues en microscopie optique, MEB, microscopie confocale et CMF pour le paramètre de SSC, nous avons pu valider notre modèle d'étude de particules micrométriques sous forme de billes fluorescentes. Les deux types de billes employées (P et I) ne sont pas toxiques pour la lignée RAW 264.7 dans les conditions utilisées (temps d'incubation et ratios billes/cellule). De même nous avons démontré que les inhibiteurs du cytosquelette d'actine employés comme témoins (Cyt-D, Lat et Jasp) ne sont pas toxiques dans les conditions expérimentales testées (concentrations et durées d'incubation).

Par ailleurs, nous avons confirmé et exploité au mieux l'effet « quencher » ou d'extinction de fluorescence par le BT. Les résultats obtenus sont en accord avec la dynamique du processus de phagocytose car le traitement avec les inhibiteurs des filaments d'actine diminue à la fois la MFI (quantification directe de la fluorescence des billes) ainsi que le pourcentage de cellules phagocytantes tandis qu'une fixation au PFA annule totalement le processus de phagocytose.

Concernant les témoins, les techniques de CMF et de microscopie ont montré de façon complémentaire que la Cyt-D, la Lat et la Jasp constituaient des inhibiteurs partiels (au maximum efficaces à 50%) du processus de phagocytose pour les macrophages de la lignée RAW 264.7 en contact avec des billes P ou I. Le PFA a été retenu comme un témoin de non phagocytose absolu. L'ensemble de ces observations nous permet de supposer que le processus de phagocytose impliquant des réorganisations des filaments d'actine ne constitue pas le seul mode d'internalisation des billes P et encore moins des billes I. L'hypothèse la plus vraisemblable est l'implication d'autres modes d'internalisation, par exemple la pinocytose, l'endocytose médiée par les cavéoles ou la clathrine nécessitant la participation et le recrutement d'autres types de filaments du cytosquelette que l'actine.

Les études en CMF ont montré qu'à ratio équivalent, les billes P sont quantitativement plus phagocytées que les billes I sur la base des résultats de MFI et de pourcentage de cellules phagocytantes pour un temps d'incubation donné. De plus, nous avons observé une augmentation importante du SSC en présence de billes P, mais beaucoup plus faible en présence de billes I. Les billes I étant deux fois plus petites que les billes P, elles doivent beaucoup moins diffracter les rayons incidents. Cependant la taille des billes ne suffit pas à expliquer cette nette différence de phagocytose entre les billes P et I. Les groupements de surface présents sur les billes jouent certainement un rôle essentiel sur la quantité de billes phagocytées, sachant que les billes P possèdent des groupements de surface carboxylate et les billes I des groupements amine. La fixation au PFA nous apporte des indications supplémentaires pour cette réflexion. En effet les cellules fixées au PFA perdent leur différence de potentiel membranaire et il a été vu que pour cette condition, le processus de phagocytose est annulé mais l'adhésion des billes aux cellules est également diminuée. Les charges de surface des billes imposées par leurs groupements de surface

constituent donc un élément essentiel au moins pour l'étape d'adhésion du processus de phagocytose. Nous pouvons avancer l'hypothèse que de par leur revêtement amine, les billes I sont moins bien internalisées, peut-être à cause d'une phase de chimiotactisme moins efficace au cours de l'étape initiale de la phagocytose. Ces différences confirment l'importance des caractéristiques physico-chimiques des particules à étudier (taille, revêtement de surface).

Par ailleurs, les études cinétiques de la phagocytose ont montré une augmentation des trois paramètres évalués en CMF (MFI, pourcentage de cellules phagocytantes et SSC) lors de l'analyse de ratios billes/cellule croissants. Outre l'importance de la taille et des groupements de surface des billes, l'intensité du processus de phagocytose dépend donc aussi de la quantité de billes présentes dans le milieu de culture. De plus, nos observations révèlent que le processus de phagocytose semble quantitativement équivalent lorsqu'un ratio de 10 billes P pour une cellule est utilisé versus 50 billes I pour une cellule. Enfin, l'étude de ces deux ratios au cours du temps (en CMF et en microscopie à épifluorescence) a montré que la durée d'incubation optimale entre les billes et les macrophages est de 24 heures et non pas de 90 minutes arbitrairement fixées selon les données de la littérature. Cette durée d'incubation sera donc appliquée pour la suite des expériences.

De ce fait, la CMF apparaît à la fois comme un bon outil quantitatif direct du processus de phagocytose et d'analyse de l'efficacité des témoins d'inhibition du cytosquelette et du PFA. Mais cette méthodologie ne permet pas de visualiser les cellules, de sorte que nous avons réalisé en parallèle des acquisitions d'images en microscopie confocale. L'approche microscopique renseigne sur la répartition des billes fluorescentes, et notre étude a démontré la complémentarité de ces deux approches. En effet, nous avons observé que les résultats quantitatifs obtenus en CMF sont en accord avec les acquisitions d'ordre qualitatif pour la microscopie confocale en termes de quantité de billes P phagocytées, d'efficacité des inhibiteurs et de la cinétique du processus de phagocytose. Cependant nous ne pouvons pas encore réaliser de véritable quantification systématique de la fluorescence observée à partir des images obtenues en microscopie confocale. En effet, pour cela des développements sont nécessaires en analyse d'image notamment au niveau 3D. Enfin, la troisième catégorie de billes (S) nous a permis de progresser en microscopie confocale sur l'acquisition des images et le développement d'un marqueur cellulaire mieux adapté (phalloïdine) en comparaison des marquages fluorescents, membranaires (PKH26) et des lysosomes (Lysotracker®) non efficaces.

En conclusion, nous avons montré au cours de cette première partie du travail utilisant des particules micrométriques que :

- La quantification directe de la phagocytose en CMF grâce au quenching par le BT s'est révélée efficace et reproductible.
- La quantification en microscopie confocale est ralentie par les problèmes d'émission parasite de fluorescence des billes dans différentes longueurs d'onde, et sera perfectionnée à court terme.
- Les analyses de toxicité sont robustes et reproductibles.
- La physico-chimie de la particule semble jouer un rôle essentiel sur la quantité de particules internalisées.

Cette étude a permis de mettre au point différentes techniques d'évaluation de l'internalisation des particules de taille micrométrique. Les chapitres suivants vont s'attacher au développement de particules modèles de dimensions nanométriques.

II. Particules nanométriques doublement fluorescentes pour évaluer l'internalisation

II.1 Introduction et développements techniques

L'offre commerciale de particules micrométriques différentes en termes de taille et de fonctionnalisation de surface étant limitée, et de par notre nécessité d'avoir une fluorescence spécifique, nous avons souhaité faire synthétiser à façon des particules déterminées. De plus notre étude précédente a soulevé le problème du manque d'outils pour distinguer précisément les nanoparticules internalisées de celles adhérentes au niveau des membranes cellulaires.

Le pHrodo™ (Invitrogen) est une nouvelle sonde, dont les données de la littérature sont assez limitées (Miksa et al., 2009), possédant une fluorescence évolutive en fonction des modifications du pH (*Figure 50*). Ses longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement 532 nm et 495-550 nm. Lors de la phagocytose et notamment lors de la fusion des phagosomes avec les lysosomes, les phagolysosomes subissent une forte diminution du pH intravésiculaire. La fluorescence rouge de cette sonde augmente significativement lorsque le pH s'acidifie. Il serait donc possible de distinguer le matériel intracellulaire du matériel extracellulaire qui représente un problème majeur pour la réalisation d'analyses d'images et de la quantification de la fluorescence notamment en CMF, sans avoir besoin d'annuler la fluorescence présente à l'extérieur des cellules (« quenching ») avec d'autres molécules telles que le bleu trypan (Nuutila and Lilius, 2005).

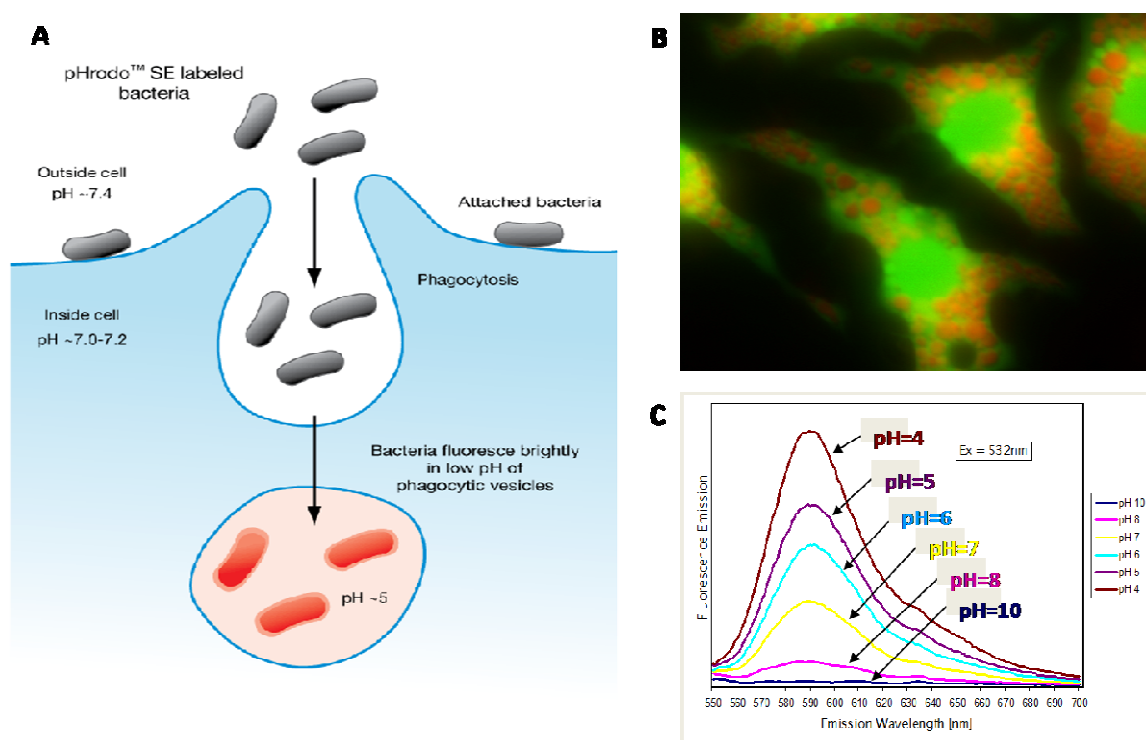


Figure 50 : Principe de fonctionnement de la sonde pHrodo. (A) Principe expliqué avec la molécule de pHrodo fonctionnalisée sur des bactéries. (B) Image illustrative. (C) Spectre d'émission de la sonde en fonction du pH.

Notre idée était donc de développer un modèle où cette sonde serait couplée à des nanoparticules fluorescentes (contenant un cœur de fluorescéine isothiocyanate - FITC) de taille

variable. Les résultats devraient être analysables quantitativement et une visualisation conjointe en microscopie confocale permettrait des études potentielles de co-localisation. Les nanoparticules pHrodo™ et FITC positives constituant la fraction des nanoparticules phagocytées par les macrophages tandis que les nanoparticules FITC positives correspondraient aux nanoparticules non phagocytées et donc non internalisées dans les vésicules acides des cellules.

Il est déjà décrit dans la littérature des systèmes de capsules ou encore de senseurs appelés PEBBLE (Probes Encapsulated by Biologically Localized Embedding) pour « sondes encapsulées par un enrobage biologique localisé » qui présentent un mode de fonctionnement similaire mais qui, pour les diverses raisons exposées ci-dessous, se sont avérés peu adaptés à notre problématique.

Les équipes de Donath et al. (**Reibetanz et al., 2010, Reibetanz et al., 2007, Romero et al., 2010**) et de Kreft et al. (**Munoz Javier et al., 2008, Semmling et al., 2008, Skirtach et al., 2006**) ont travaillé sur les capsules et l'utilisation de sondes fluorescentes telles que les SNARF dye. Les capsules généralement obtenues par synthèse multicouches à partir de CaCO₃ ou SiO₂ sont plutôt utilisées dans un contexte de vecteurs de médicaments activables. Associées à des sondes telles que les SNARF dye, elles permettent aussi de suivre le trafic vésiculaire intracellulaire. En effet, cette sonde émet une fluorescence rouge en environnement alcalin et une fluorescence verte en environnement acide. Or dans notre contexte, cette sonde est incompatible avec la juxtaposition de la fluorescence FITC au cœur de nos nanoparticules. Par ailleurs, la principale critique concernant les capsules concerne leur taille élevée, d'ordre supérieur au micromètre.

L'équipe de Kopelman et al. a travaillé sur un autre système proche du notre nommé PEBBLE (**Buck et al., 2004, Lee et al., 2009, Clark et al., 1999a, Clark et al., 1999b**). Cette équipe insiste sur l'importance du monitoring au niveau cellulaire. Ils soulèvent le problème de l'injection de sondes fluorescentes libres qui conduisent à des interférences chimiques entre la sonde et les composants cellulaires et le fait que la sonde elle-même peut être toxique pour la cellule. Ainsi, les PEBBLE correspondent à des nanosenseurs et sont un terme général qui décrit une famille de matrices et de techniques de nano-fabrication utilisées pour miniaturiser des senseurs existants. Il existe de nombreux types de PEBBLE pour faire différentes mesures, ce sont toujours des matrices inertes encapsulant des sondes de matrices inertes de petite taille (20 à 600 nm de diamètre) qui sont préparées avec des processus de nano-émulsion/dispersion. Ces systèmes sont assez proches de notre concept de nanoparticules doublement fluorescentes mais il n'apparaît pas réellement possible de contrôler la chimie de surface en dehors d'une fonctionnalisation avec des groupements PEG. Or dans nos perspectives d'études nous souhaitons disposer de nanoparticules fluorescentes avec une surface spécifique contrôlée afin d'étudier plus spécifiquement l'impact de ce paramètre sur l'activité de phagocytose et la toxicité.

La société Nano-H est spécialisée dans la production et l'adaptation de nanoparticules. Elle contrôle (procédé breveté) la synthèse, la fonctionnalisation de surface et la taille des nanoparticules produites. Son expertise permet également de stabiliser des nanosondes multidéTECTABLES (optique, magnétique, etc.) pour des déteCTIONS *in vivo* et *in vitro*. Nano-H, fabrique et commercialise des produits à base de nanoparticules hybrides : oxydes ou métaux, simples ou mixtes par accrochage de molécules organiques ou biologiques sur des particules minérales.

Notre cahier des charges était précis et les nanoparticules produites à façon devaient répondre à nos attentes en terme de rendement de fluorescence compatible à la fois avec les analyses en CMF et en microscopie (épi-fluorescence, confocale). Malheureusement, la quantification en CMF utilisant le quenching au bleu trypan développé pour le modèle de particules micrométriques s'est avérée non concluante avec le modèle de particules nanométriques. Cette partie du travail s'est donc attachée à mettre au point les nanoparticules sensibles au pH et le point de vue quantitatif n'est abordé que par les techniques d'imagerie.

Afin de remplir nos critères, divers lots de nanoparticules ont été synthétisés puis testés avant de donner entière satisfaction. Nous nous proposons ici de donner quelques éléments sur les différentes mises au point effectuées avant de présenter les travaux que nous avons soumis à *Journal of Nanopart Research*.

II.1.1 Synthèse des nanoparticules fluorescentes

La société Nano-H a proposé suite au cahier des charges que nous leur avons soumis, le développement et la fourniture de lots d'échantillons à base de silice fluorescente (FITC) fonctionnalisée par un enrobage contrôlé de polysiloxane pouvant être poreux pour incorporer par liaison covalente la sonde sensible au pH (pHrodo™). Les particules ont été stabilisées par des acides carboxyliques de surface (**Figure 51**).

Ainsi à chaque fois nous avons comparé des nanoparticules dites « classiques » sans pHrodo™ et des nanoparticules dites « pHrodo » avec pHrodo™. Nous avons décidé d'utiliser la FITC au niveau du cœur de la particule car c'est un fluorophore très couramment utilisé malgré le fait que la stabilité de sa fluorescence soit controversée en fonction du pH environnant. Mais de par le procédé de synthèse, cet inconvénient est abrogé dans notre cas précis, l'enveloppe de la nanoparticule ainsi que le cœur de silice protègent de façon efficace le fluorophore (Sjöback et al., 1995).

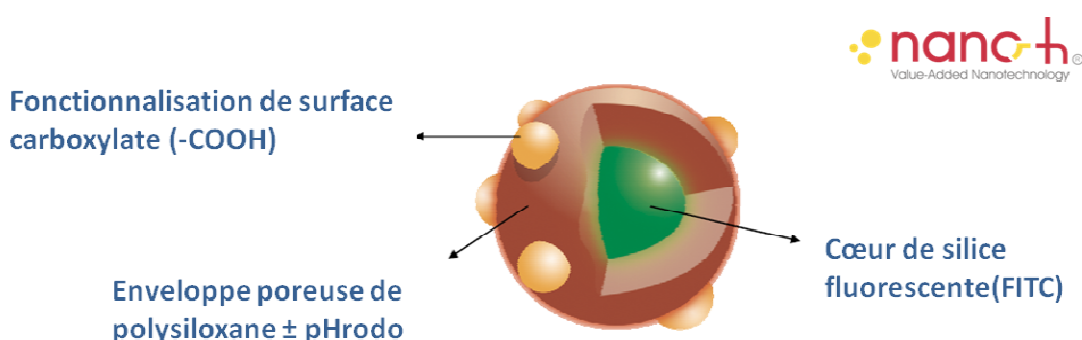


Figure 51 : Structure schématique des nanoparticules développées.

1- Cœur à base de silice luminescente et de molécules de type FITC.

2- Enrobage contrôlé de surface permettant l'incorporation de la sonde sensible au pH : pHrodo.

3- Post-fonctionnalisation avec des acides carboxyliques pour assurer une stabilisation de surface.

Nano-H à proposé de livrer de dix à quinze échantillons provenant de différentes conditions de synthèse. Concernant le pHrodo, des essais préliminaires ont été nécessaires à l'optimisation de la quantité de molécule à greffer pour une visualisation optimale.

Les nanoparticules sont obtenues par la technique de « synthèse en microémulsion inverse » qui permet l'obtention d'un cœur de silice encapsulé dans une couche de polysiloxane fluorescente. A l'origine, des micelles inverses sont créées, séparant la phase aqueuse de la phase organique apolaire. Chaque micelle sert de nano-réacteur au sein de laquelle tous les réactifs (silice, silanes, fluorophores, catalyseurs) s'accumulent créant ainsi des objets compacts, et empêchent la coalescence entre particules voisines. En effet, pendant la synthèse, comme les espèces chimiques sont polaires, la constante d'équilibre des réactifs est favorable à la phase aqueuse et les réactions de nucléation en solution puis de gélification (sol-gel) vont se produire à l'intérieur des micelles.

L'immobilisation des fluorophores de FITC a lieu au début de la réaction lors de la formation du cœur de silice. La synthèse du cœur se fait selon un procédé sol gel en milieu basique (**Van Blaaderen and Vrij, 1992**). Le cœur de silice est formé en y incorporant de la FITC par réaction organique entre l'aminopropyl triethoxysilane (groupes NH_2) et la FITC.

L'ajout de la sonde pHrodo est réalisée dans un second temps par couplage du pHrodo à l'APTES, un des précurseurs de la couche de polysiloxane. L'enrobage (procédé sol gel également) est particulier avec un mélange de TEOS/APTES catalysé en milieu basique par la triéthylamine (**Fizet et al., 2009**).

II.1.2 Données sur les mises au point des nanoparticules

Une vingtaine de lots de nanoparticules ont été testés afin de mettre au point le procédé de fabrication de ces particules modèles en termes de fluorescence (FITC et pHrodo) et de taille.

Les différents types de nanoparticules testées sont récapitulés dans le **Tableau 7**.

- Les particules dites classiques ont une fluorescence FITC seulement.
- Les particules dites pHrodo ont une double fluorescence FITC et pHrodo.
- La particule «enveloppe» correspond à un essai où la globalité de la particule était recouverte par une enveloppe protectrice, mais ce procédé a été abandonné car la fluorescence de la particule n'était plus détectable. Les particules dites « nvx procédé » et « nvx procédé 2 » correspondent à des essais de techniques de synthèse différentes.

Concernant la dénomination, et plus particulièrement sur les différentes figures, les nanoparticules sont en général indiquées par NP suivi de la taille en nanomètre et du pourcentage de fluorophore (par exemple NP500 5% FITC).

Particules (H ₂ O pH 9)	Lot	Date	Taille (nm)	DLS (nm)	% FITC	% pHrodo	Fonction surface	Nombre de particules théorique/mL	Microscopie	CMF	CV (CMF)
classique	170-09	28/04/2009	500	712 ± 13	1,23%	*	COOH	2,46 * 10 ¹¹	Mauvais	Fluo faible	41
pHrodo	178-09	11/05/2009	500	512 ± 6	1,23%	0,5%	COOH	8,6 * 10 ¹¹	Mauvais	Non détectables	*
classique	180-09	18/05/2009	500	434 ± 11	3%	*	COOH	1 * 10 ¹²	Mieux	Fluo faible	85
classique	181-09	18/05/2009	500	425 ± 7	5%	*	COOH	1,2 * 10 ¹²	Ben	Fluo ok	74
enveloppe	182-09	18/05/2009	400	371 ± 5	1,23%	*	COOH	1,7 * 10 ¹²	Mauvais	Fluo très faible	50
nvx procédé	212-09	11/06/2009	400	278,1 ± 12,8	2%	*	COOH	3,83 * 10 ¹¹	Mieux	Fluo ok	16
nvx procédé ?	214-09	22/06/2009	50	*	1,40%	*	COOH	4,32 * 10 ¹⁴	Mieux	Fluo ok	114
pHrodo	231-09	07/08/2009	250	368	2%	0,1%	COOH	2,42 * 10 ¹²	Fluo FITC OK et stable	Fluo pHrodo non détectable	44
pHrodo	232-09	07/08/2009	250	*	2%	0,2%	COOH	2,28 * 10 ¹²	Sans acide le bruit de fond en Cy3 augmente en fonction du % de pHrodo		47
pHrodo	233-09	07/08/2009	250	408 ± 6	2%	0,3%	COOH	2,45 * 10 ¹²			50
pHrodo	234-09	07/08/2009	250	408 ± 6	2%	0,6%	COOH	2,13 * 10 ¹²			48
pHrodo	235-09	07/08/2009	800	*	2%	< 0,5%	COOH	1,09 * 10 ¹¹			53
classique	236-09	07/08/2009	770	770,3	2%	*	COOH	2,78 * 10 ¹¹	Ben	Fluo ok	40
classique	277-09	30/09/2009	250	269±10	2%	*	COOH	2,8 * 10 ¹²	Ben	Fluo ok	65
pHrodo	278-09	30/09/2009	250	307,3	1,23%	0,5%	COOH	4,4 * 10 ¹²	Ben	Fluo FITC ok	44
pHrodo	279-09	30/09/2009	250	312	2%	0,5%	COOH	4,7 * 10 ¹²	Ben	Fluo pHrodo non	41
classique	024-10	05/03/2010	500	772,3	1,23%	*	COOH	3,2 * 10 ¹¹	Ben	Fluo ok	*
pHrodo	025-10	05/03/2010	500	*	1,23%	2,0%	COOH	4,5 * 10 ¹¹	Ben	Fluo ok	*
classique	036-10	11/03/2010	500	*	1,23%	*	COOH	3,2 * 10 ¹¹	Ben	Fluo ok	*
classique	037-10	11/03/2010	700	959,7	2%	*	COOH	1,5 * 10 ¹¹	Ben	Fluo ok	*

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différents types de nanoparticules testées au cours de la collaboration avec Nano-H. Les caractéristiques des nanoparticules sont résumées : lot, date, taille, pourcentage de fluorochromes, fonctionnalisation de surface et nombre de particules théorique par mL. Les données de microscopie correspondent à une évaluation visuelle. Enfin, pour la CMF les données reflètent la capacité de détection de la fluorescence et la valeur du coefficient de variation (CV) reflétant l'homogénéité de répartition de la fluorescence verte (FITC) au sein de l'échantillon analysé.

Pour chaque lot de particules reçues, différents paramètres ont été évalués :

- La stabilité de la fluorescence sous le faisceau du microscope à épi-fluorescence.
- La capacité de détection des particules en CMF.
- Le coefficient de variation des nanoparticules en CMF, de façon à déterminer l'homogénéité de la distribution en taille des nanoparticules testées.

Pour les évaluations en épi-fluorescence, quelques microlitres de nanoparticules pures ont été montés entre lame et lamelle et observés directement avec un microscope à épi-fluorescence. Les nanoparticules ont été observées sous les différents filtres de façon à vérifier la spécificité de la fluorescence de la FITC et sa stabilité sous le faisceau (photobleaching).

Concernant la capacité de détection des particules en CMF, 4 µL de nanoparticules pures étaient mélangés à 500 µL de FACS Flow (liquide de gaine du cytomètre). La capacité de détection des nanoparticules par l'appareil a été observée. De plus les coefficients de variation (CV), soit l'homogénéité des particules ont été mesurés.

La **Figure 52** présente quelques exemples de profils de cytogrammes obtenus en CMF lors de l'analyse du CV. Les valeurs obtenues pour chacun des différents types de nanoparticules testées sont résumées dans le **Tableau 7**. Il est apparu que les nanoparticules fournies dans les premiers lots par Nano-H présentaient d'importantes variations au niveau des CV, ce qui nous a conduit à tester de nouveaux procédés de fabrication des nanoparticules dans le but de réduire l'importance de ce CV pour se rapprocher d'un CV optimal de 5 correspondant à celui observé pour les billes P.

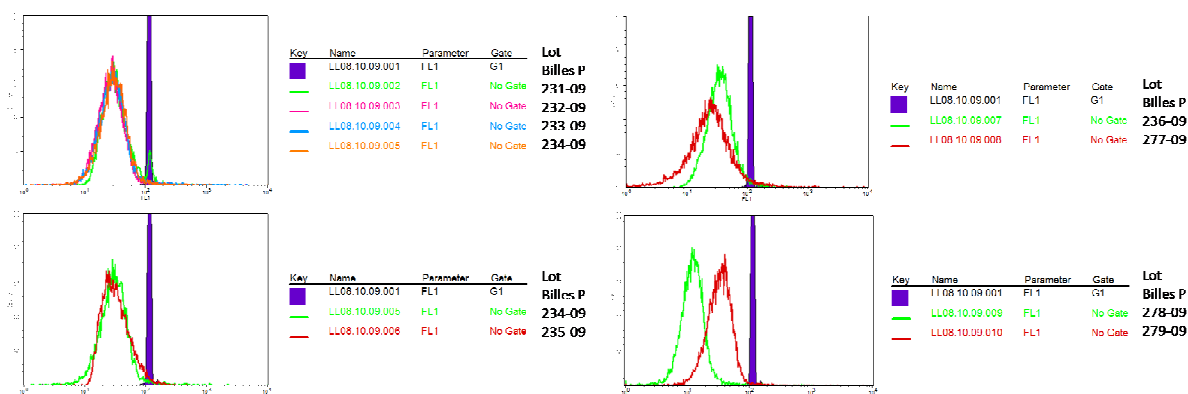


Figure 52 : Exemples de cytogrammes obtenus lors de l'évaluation des coefficients de variation en CMF pour différents lots de nanoparticules testés. L'axe des ordonnées présente le nombre d'évènements tandis que l'axe des abscisses reflète l'intensité de fluorescence sur le canal FL1 (fluorescence verte correspondant à la FITC contenue dans les nanoparticules). Ce type de cytogrammes permet d'obtenir la valeur du CV.

La dernière analyse réalisée sur les lots de nanoparticules a concerné la caractérisation de la distribution en taille grâce à la technique de DLS. La **Figure 53** donne un exemple de profils obtenus grâce à cette technique (**ANNEXE II.4.1**).

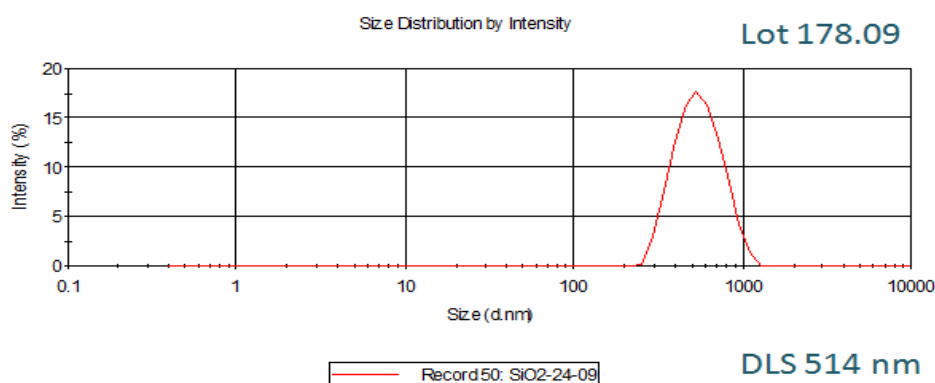


Figure 53 : Profil de distribution en taille obtenu avec la technique de DLS. Exemple présenté pour le lot de nanoparticules 178.09.

Le **Tableau 7** résume les résultats de ces caractérisations pour presque tous les types de nanoparticules. Il s'agissait de vérifier que la taille effective des nanoparticules correspondait bien à celle annoncée par Nano-H. Cependant des écarts non négligeables ont été notés entre la taille prévue et la taille évaluée par DLS. Des analyses ont aussi été effectuées par MET (**ANNEXE II.2.2**) sur certains lots de façon à vérifier que les lots présentaient a priori toutes les qualités requises.

Finalement après optimisation, l'étude présentée dans la publication suivante intitulée « *Quantitative cellular uptake of double fluorescent core-shelled model nanoparticles* » a été effectuée sur des nanoparticules bien caractérisées avec et sans pHrodo de 250 et 500 nm de diamètre.

Ces travaux ont été soumis à *Journal of Nanoparticles Research*.

II.2 Publication 2 - Soumise

Quantitative cellular uptake of double fluorescent core-shelled model submicronic particles

Lara Leclerc, Delphine Boudard, Jérémie Pourchez, Valérie Forest, Laurence Marmuse, Cédric Louis, Valérie Bin, Sabine Palle, Philippe Grosseau, Didier Bernache-Assollant, Michèle Cottier

*L. Leclerc (Corresponding-Author), J. Pourchez, V. Forest, P. Grosseau, D Bernache-Assollant
Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, LINA EA 4624, F-42023, Saint-Etienne,
France*

e-mail: leclerc@emse.fr Phone: (+33) 4 77 49 97 00 Fax: (+33) 4 77 49 96 94

*D. Boudard, V. Bin, M. Cottier
LINA EA-4624, F-42023, Saint-Etienne, France*

*L. Marmuse, C. Louis
NANO-H S.A.S., 2 place de l'Europe, Bâtiment A, Parc d'activité GVIO, F-38070, Saint Quentin
Fallavier, France*

*S. Palle
Université Jean Monnet, Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique, Pôle Optique et
Vision, F-42023, Saint-Etienne, France*

Abstract *Introduction:* The investigation of the relationship between particles' physicochemical parameters, their uptake by cells and their degree of biological toxicity represent a crucial issue especially for the development of new technologies such as fabrication of micro- and nano-particles for the promising field of drug delivery systems. This work aimed at developing an original model of double fluorescence submicronic particles that could be spotted inside phagolysosomes.

Materials and methods: FITC particles were synthesized and then conjugated with a fluorescent pHrodo™ probe whose red fluorescence increased in acidic conditions such as lysosomal content.

After validation in acellular conditions by spectral analysis using confocal microscopy and dynamic light scattering, quantification of phagocytosis was conducted *in vitro* on a macrophage cell line. The impact of pHrodo™ functionalization on these particles' biological effects (cytotoxicity, inflammatory response and oxidative stress) was also investigated.

Results/Conclusion: Results validate the proof of concept of double fluorescent particles (FITC + pHrodo) allowing detection of entirely engulfed pHrodo particles (green and red labelings). Moreover incorporation of pHrodo™ had no major effects on cytotoxicity as compared to particles without pHrodo™ making them a powerful tool for micro and nanotechnologies.

Keywords *Fluorescent submicronic particles, cellular uptake, pHrodo™, toxicity.*

Introduction

Nanotechnology is an emerging multidisciplinary field that involves the synthesis of materials in the nanoscale (i.e., 10^{-9} m) size range. The development of nanoparticles currently represents a significant issue for environmental sciences, biosciences and nanomedicine (Oberdorster et al. 2005). Their physicochemical features confer them specific properties depending on their application domains (Broz et al. 2006; Nan et al. 2008). It is now generally recognized that ongoing assessments of the human health and ecological implications of exposure to nanoscale materials are necessary prerequisites before the commercial benefits of this technology can be fully realized (Warheit 2010).

Given the excitement associated with all nanotechnology applications, evaluating the potential hazards related to nanomaterials has become an emerging area in toxicology and health risk assessment (Clift et al. 2008; Fubini 1998; Fubini et al. 2004; Sayes et al. 2007; Warheit et al. 2004). Particle surface and interfaces are important components of nanoscale materials (Warheit 2008). It has been demonstrated in the literature that nanoparticles' toxicological effects are complex and involve a variety of factors, chief among them physicochemical characteristics (Warheit 2010; Warheit et al. 2007). Taking into account this knowledge, physicochemical characteristics of the fluorescent particles developed in this study (*i.e.* size and chemical coating) were well-controlled, specifically all the steps of particles synthesis were described and the surface functionalization was homogeneous, preventing agglomeration phenomena. The control of the physicochemical parameters was one of the main points of the particles' specifications, offering the possibility to functionalize them with other surface groups and different surface charges.

Whatever the pathway of entrance of the particles in the organism (skin, digestive tract, respiratory tract or by injection), phagocytic cells such as macrophages appear as one of the main target cells. Indeed they are sentinel cells belonging to the immune system whose main role consists in the internalization and destruction of foreign bodies by the phagocytic process. Macrophages represent a model of cells widely used in toxicological evaluations (Bruch et al.

2004; Clift, Rothen-Rutishauser et al. 2008; Fubini et al. 2004; Hamilton et al. 2008; Sayes et al. 2007).

The level of biological effects may be influenced by the amount of internalized particles in macrophages (Cho et al. 2009; Nan et al. 2008). Different metrical systems could be used such as surface, volume or number of particles. The mass of the material appears to be the less appropriate metric yet the most easy to measure (Fubini et al. 2010). The number of particles might be a more appropriate metric for uptake evaluations and was therefore used in this study. However it remains difficult to precisely quantify this amount within the intracellular compartments (Bos et al. 2000; Leclerc et al. 2010). During the phagocytic process, foreign particles are internalized into vesicles called phagosomes whose content acidifies after fusion with lysosomes, another type of intracellular acidic vesicle, to form a phagolysosome. pH is around 6 in phagosome and decreases to 4.5 in the fully matured phagolysosome which is an hydrolase-rich killing device (Griffiths 2004; Vieira et al. 2003). We took advantage of this property of acidification and developed double fluorescent particles sensitive to environmental pH changes in order to use them as a tool for phagocytosis quantification. For this purpose and for the first time in the literature, we coupled FITC fluorescent particles with pHrodo™ Succinimidyl ester probe (Invitrogen) (Harvey et al. 2008; Kobayashi et al. 2010; Miksa et al. 2009; Moore et al. 2008; Strunnikova et al. 2009). The red fluorescence intensity of this probe increases with pH acidification and accurately indicates its phagolysosomal localization.

Thus, our system directly detects particles engulfed in phagolysosomes, unlike existing systems described in the literature such as PEBBLE, (Buck et al. 2004; Clark et al. 1999; Lee et al. 2009) or capsules (fluorescent microcapsules), (Reibetanz et al. 2010; Reibetanz et al. 2007; Romero et al. 2010) which monitor intracellular pH changes. These micro- or nanostructures coupled with molecules such as SNARF dye, (Munoz Javier et al. 2008; Semmling et al. 2008) are known to function as pH-sensors. Indeed, intracellular pH plays a key role in the regulation of different cellular processes (*e.g.* apoptosis, phagocytosis, cell growth, metabolism, etc.). It must be

maintained at an optimal value and the knowledge of its alteration in complex biological samples is crucial. Moreover there is a clear need for pH-monitoring strategies that are non-invasive, sensitive, quantitative, stable, reproducible and that could be applied in real-time conditions (Peng et al. 2007). Systems such as PEEBLE or capsules have been developed for this purpose. But our concern is different, and these tools cannot be used for our purpose: the major problem with the capsules is their micrometric size even if their strategy is quite similar (Sjöback et al. 1995). They are mainly developed for drug delivery system applications. PEBBLE systems are not suitable for our study as we do not want to monitor precise pH changes during the phagocytic process but to localize particles in any type of acidic compartment. Moreover particles' sizes and surface charges should vary which seems difficult with systems such as PEBBLE that we cannot synthesize. It seems difficult to control surface groups and sizes of PEBBLES during the synthesis process which is a crucial step for a specific study of the cellular uptake.

Finally we investigated the innocuousness of the particles' functionalization with the pHrodoTM probe establishing comparisons between particles of equivalent sizes with and without pHrodoTM. The biological effects were evaluated according to different cellular parameters: inflammatory response with Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) production, integrity of the cell membrane with Lactate Dehydrogenase (LDH) release and the oxidative stress following production of Reactive Oxygen Species (ROS) (Bruch et al. 2004; Catelas et al. 1999; Donaldson et al. 2002; Sayes et al. 2007).

This study can be divided into two main parts. First the synthesis of fluorescent particles of two sizes (250 and 500 nm), with or without incorporation of the pH sensitive probe pHrodoTM, exhibiting specific carboxylate functionalization. These particles were characterized and their fluorescence emission spectra were validated in acellular conditions. The second part presents a proof-of-concept of the use of these double fluorescent particles for the detection of particles phagocytosis after contacts with a macrophage cell line.

Experimental

Fluorescent particles development

Tetraethyl orthosilicate ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, TEOS, $\geq 99\%$), (3-aminopropyl)triethoxysilane ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{-Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, APTES, 99%), isopropanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, $\geq 99,5\%$), triethylamine ($(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, $\geq 99,5\%$, dimethyl sulfoxide anhydrous ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, DMSO, $\geq 99,9\%$) Fluoresceine isothiocyanate Isomere I ($\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$, FITC, $\geq 90\%$), sodium hydroxyde (NaOH) were purchased from Aldrich chemical (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France). Diethylenetriamine pentaacetic dianhydride ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_8$, DTPA-ba, $> 98.0\%$) was purchased from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). pHrodo™ succinimidyl ester (pHrodo,SE) was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Ethanol, diethylene glycol (DEG, 99%) and other organic solvents (reagent grade) were purchased from SDS (France) and used as received.

Two types of fluorescent particles with variable and well-defined sizes (250 and 500 nm) have been developed and produced (Nano-H, France). The particles were composed of pure silica core doped with FITC (green fluorescence) grafted by covalently bonds, as described by Van Blaaderen et al. (1992) and Wang et al. (2003). Then a controlled polysiloxane shell (SiO_x) was added, by hydrolysis condensation of APTES and TEOS using isopropanol as solvent in the presence of a catalytic amount of triethylamine (Fizet et al. 2009). During this step a functionalization using pHrodo™ probe could be performed by adding in desired percentage the reaction product of the coupling between the dye using APTES in DMSO. The amorphous and porous properties of their polysiloxane shell allowed the probe accessibility to the pH variations. Finally the particles were stabilized by introducing carboxylic surface groups (COOH) onto their surface using diethylenetriamine pentaacetic dianhydride DTPA-ba as reagent. The synthesis was realized as follows: DTPA-ba (one equivalent/APTES) was stirred in DMSO (15 mg mL^{-1}) at room temperature during 15 minutes. Then a colloidal solution of particles in DMSO (25 mg mL^{-1}) was added to the reaction and stirred for 18 hours at room temperature. A purification step was achieved by an initial centrifugation at 7000 rpm for 10 minutes followed by a redispersion in

ethanol and a subsequent centrifugation (3 folds, 7000 rpm for 10 minutes). The particles were then redispersed in Milli-Q water in desired concentration (particles number/mL) at pH 9.

Thus, two types of particles were synthesized:

- FITC particles exhibiting only a green fluorescence,
- FITC/pHrodo particles exhibiting a double fluorescence including red fluorescence of pHrodo probe which increases as pH acidifies allowing the detection of intra-lysosomal engulfed particles (access to double fluorescence green/red in acidic conditions).

The fluorescence of the particles was optimized by testing different percentages of dyes (Supplementary Table), ranging from 1.23% to 5% (% m/mSiO₂) for FITC grafting into the silica core and 0.1% to 2% for pHrodo grafting into SiO_x (% n/nSiO_x). Excitation and emission data of the dyes were: FITC (ex: 488 nm; em: 495-550 nm), pHrodo (ex: 532 nm; em: 560-650 nm).

Particles characterization

Size distribution and zeta potential were measured using dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano S from Malvern instrument (Orsay, France). Three measurements were directly taken on the colloidal solution after surface modification in water. Analyses were also carried on in complete culture media.

Transmission electron microscopy (TEM) observations were performed. Samples were prepared by diluting a solution of particles and depositing a drop of it on a copper grid coated with a thin film of amorphous carbon and allowing the liquid to air dry at room temperature. Images were acquired with a transmission electron microscope (Jeol 2010, Tokyo, Japan) operating at 200 kV.

The fluorescence specificity of the particles was determined by confocal spectral analysis in acellular conditions. Analyses were performed using a confocal microscope TCS-SP2 from Leica Microsystems (Leica®, Heidelberg, Germany) coupled to an inverted microscope with oil immersion objective (HCX APO L U-V-I 63x1.2NA), and fitted with Acousto-Optical Beam

Splitter (AOBS) covering a 350-850 nm wavelength range. The system was equipped with a set of lasers: argon (458, 476, 488 and 514 nm), helium-neon (543 nm), helium-neon (633 nm) lasers for classical CLSM, and a Coherent© Ti:Sapphire MIRA 900 oscillator pumped with a 5 W Verdi Nd:YAG (532 nm) laser. The femtolaser system delivered typically 800 mW, 200 fs pulses with a 76 MHz repetition rate. Suspensions of particles were placed in appropriate cup-shaped (4 wells Lab-Tek™ Chamber Slides, Nunc®) and emission fluorescence spectral curves were collected with 10 nm resolution over the wavelength range of 400 to 800 nm using two-photon excitation and AOBS. For FITC/pHrodo particles, acquisitions were done in buffer solutions of different pH (pH4 and pH10).

Macrophage cell culture

The RAW 264.7 cell line was provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem LGC, Molsheim, France) deriving from murine peritoneal macrophages transformed by the AML Virus (Abelson Murine Leukemia Virus). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen), complemented with 10% of fetal calf serum (FCS, Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (penicillin 10 000 units/mL, streptomycin 10 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and incubated at 37°C under a 5% carbon dioxide humidified atmosphere.

The particles' fluorescence was assessed after a 24 hour incubation with macrophages using an arbitrary ratio of 1000 particles for one cell (1000/1 ϕ) based on the macrophage size compared to the particles sizes. Particles were strongly vortexed during 30 seconds before use.

Treated cells electron microscopy

Cells were grown in six-well plates (1 million cells in 4 mL of complete culture medium) containing coverslips. Particles were incubated for 24 hours.

For Scanning Electron Microscopy (SEM) observations, samples were fixed for 15 min with 2.5% glutaraldehyde (Sigma) and dehydrated in acetone baths of increasing concentrations (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% and 99%, 10 min/bath) (Di Palma et al, 2004). Coverslips were sputtered with gold coating and examined with a FEG-SEM (Field Emission Gun, 6500F Jeol, Japan).

For Transmission Electron Microscopy (TEM) observations, samples were fixed in 1% glutaraldehyde/0.5% paraformaldehyde in 0.1 M mono Na/diK buffer (pH 7.4), postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 hour, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Epon resin. Ultrathin (70 nm) sections were cut and stained with uranyl acetate and lead citrate. Images were acquired with a transmission electron microscope (MET Hitachi H800-3, Tokyo, Japan) equipped with a CCD camera (XR40; AMT).

Confocal imaging and phagocytosis semi-quantification

Cells were grown in six-well plates (1 million cells in 4 mL) containing coverslips. Particles were incubated for 24 hours. Wells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes and washed with Phosphate Buffered Saline (PBS, VWR, Fontenay sous bois, France) in order to remove the exceeding non adherent or non internalized free particles that remained in the supernatant. However, this wash did not eliminate the particles adherent to the cell membrane. Finally cell nuclei were stained with 10 μ M of Hoechst 33342 solution (Sigma) for 15 minutes and rinsed with PBS. Images were obtained from the fluorescence emitted by FITC (ex: 488 nm; em: 495-550 nm), pHrodo (ex: 532 nm; em: 560-650 nm) and Hoechst (ex: 350 nm; em: 408-443 nm). Results are expressed as means of the fluorescence of acquired images stacks. Three independent analyses were performed in duplicate.

Stacks obtained by confocal imaging (green and red fluorescence) were treated separately with a computer interface (Matlab®). Stacks were transposed to grey levels followed by an automatic

thresholding allowing obtention of arbitrary values of the number of green and red pixels. Then a ratio was established between red and green pixels leading to a percentage of internalized particles.

Toxicity assessment

For each experiment, cells were prepared in 96-well plates (100 000 cells/well for TNF- α and LDH assays, and 300 000 cells/well for ROS and H₂O₂ parameters) in 25 μ L of complete DMEM as previously described (Leclerc et al. 2010). Particles (1000/1 ϕ in a volume of 75 μ L of DMEM) were then added to the culture and incubated for 24h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. In each case, control cells were incubated in the same conditions but without particles.

TNF- α production was assessed from the supernatant using a commercial ELISA Kit (Quantikine® Mouse TNF- α Immunoassay, R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. The optical density of each well was determined using a microplate reader (Multiskan RC, Thermolabsystems, Helsinki, Finland) set to 450 nm. A standard curve was established and results were expressed in pg/mL of TNF- α .

The activity of the lactate dehydrogenase (LDH) released from cells with damaged membranes was assessed using the CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, Charbonnières les bains, France) according to the manufacturer's instructions. Detection was performed with a fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems), using excitation/emission wavelengths at 530/590 nm. The activity of the released LDH was reported to that of total cellular LDH (measured after the lysis of control cells) and was expressed as a percentage of the control.

Concerning oxydative stress, a large array of ROS activity was assessed with the OxiSelect™ ROS Assay Kit (Euromedex, Mundolsheim, France). The assay is based on the conversion of a non fluorescent substrate, 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), which can easily diffuse through cell membranes, into a fluorogenic molecule DCF (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein) which is highly fluorescent and whose amount is proportional to total ROS level. DCF production was detected with a Fluoroskan Ascent fluorometer

(Thermolabsystems) using excitation and emission wavelengths of 480 nm and 530 nm respectively and expressed as nM per hour.

Finally, the release of specific Hydrogen Peroxide (H_2O_2) was measured as described by De la Harpe and Nathan (1985). After incubation, cells were stimulated to release the hydrogen peroxide produced by addition of 100 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma). Briefly, Krebs-Ringer phosphate glucose (KRPBG) buffer containing a mixture of scopoletin (30 μ M), NaN_3 (1 mM) and horseradish peroxidase (1 unit pupurogallin/ml HPO) was added to the cells. The horseradish peroxidase catalyzed the oxidation of the fluorescent scopoletin which was measured over a period of 90 min (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems) using excitation/emission wavelengths at 355/460 nm. Results are expressed as means of arbitrary units of fluorescence.

Statistical analysis

Analysis and graphics were performed using Prism 5.0 software (GraphPad®, San Diego, CA, USA). Significance was established with ANOVA test ($p < 0.05$).

Results and discussion

Particles development and characterization

This study aimed at developing a new concept of double fluorescent particles devoted to biological investigations, which particularly makes sense for the study of phagocytosis. pHrodo probes which fluorescence intensity enhances as pH acidifies, have been functionalized in particles porous shell. A schematic representation of the two types of fluorescent particles developed is presented on Fig. 1. FITC particles exhibit green fluorescence only, while FITC/pHrodo particles can emit either a green or a yellow fluorescence. This latter is observed in acidic conditions and is due to the colocalization of both green and red fluorescences (the red fluorescence of pHrodoTM appearing as pH acidifies).

DLS and TEM characterization were then performed in order to validate the synthesis of well standardized particles, and to control size, shape and agglomeration in the tested media. Results are reported in Table 1 and an example of TEM acquisition is given in Fig. 2a. Globally, the particles sizes measured by DLS and TEM were in good agreement with the expected sizes (250 and 500 nm respectively). Size distributions in deionized water and in culture media were quite similar with a slight increase in culture media. This could be due to the adsorption of proteins or other biomolecules at the surface of the particles in culture media. Moreover these particles appeared to be well individualized on images. There was no evidence of agglomeration phenomena, especially in presence of FCS maybe because particles were produced directly in suspension, thus avoiding problems due to the dry-wet transition of particles powders and also because of the high stability of the particles allowed by the great homogeneity of the COOH groups at their surface. These data are strongly supported by the zeta potential values which are always negative even if they significantly increased in complete culture media. However for the various types of particles, zeta potential values were quite similar in water and in complete culture media suggesting that surface chemistry of the particles was well-controlled.

Concerning the optimization of dye amount, fluorescence intensity and dye stability (photobleaching) were checked under the confocal beam. For FITC particles, due to the fluorescence extinction, the best yield was obtained for 2% FITC. For FITC/pHrodo particles, the best ratio was 1.23% FITC - 2% pHrodoTM. The adjustment of the percentages of dyes was an essential step in finding the optimal ratios which were then used in the whole study (Supplementary Table).

The fluorescent emission spectra were then analyzed in acellular conditions in order to validate this innovative concept of double fluorescent particles. Fluorescence emission spectra were realized in confocal microscopy ranging from 400 to 800 nm. We confirmed that emission spectra fit adequately with the dyes used in the two types of particles. Fig. 3a shows the spectrum for 500 nm particles with 2% FITC. As FITC is deeply anchored, the fluorophore was not subjected to pH

variations. The graphic presents a well-defined peak characteristic of the FITC emission. To verify the pHrodoTM probe's functioning, the emission spectra of FITC/pHrodo particles were determined either in a basic solution (pH10) or in an acid solution (pH4) and were reported in Fig. 3b and 3c. At pH10 (Fig. 3b), only one peak was observed, confirming the specificity of FITC fluorescence. Moreover, this spectrum shape was similar to that of simple FITC particles (Fig. 3a). However, a significant difference in FITC fluorescence intensity was observed due to the difference of FITC percentage (2% vs. 1,23%) between FITC particles and FITC/pHrodo particles. At pH4 (Fig. 3c), two peaks specific of FITC and pHrodoTM probe respectively could be clearly distinguished, confirming the concept of the double fluorescence of these particles in acidic conditions.

As expected, the spectrum of FITC particles was specific to FITC fluorescence while the spectrum of FITC/pHrodo particles was specific to FITC with an apparition of the pHrodo probe specific fluorescence in acidic conditions. It has already been described in the literature especially by Peng et al. (2007) that FITC could be pH-sensitive and therefore, FITC is sometimes directly used to monitor pH changes (Reibetanz et al. 2007; Skirtach et al. 2006). It is known that weak pH values (< 4) lead to a FITC fluorescence decrease. In this study, as previously mentioned, the FITC was deeply anchored in the core-shell of the particles with no access to external environment. The chemical manufacturing of the particles have been successfully adapted to biological applications, especially to confocal microscopy. Indeed we did not want to precisely monitor pH modifications, but our aim was to track particles engulfed in acidic compartment. In this context, the apparition of the pHrodo red fluorescence was the determinant parameter.

Cellular assays

Once the particles' features were characterized, cellular assays were performed. The RAW 264.7 macrophage cell line was used as a representative model of the pulmonary cellular environment that particles are likely to interact with *in vivo*.

Interactions between macrophages and particles were observed using SEM. As illustrated in Fig. 2b, this technique allowed us to highlight the behavior of macrophages in contact with particles and confirmed their interactions, particularly at the level of macrophage podosomes (white arrows).

After a 24 hour contact with macrophages, 500 nm FITC particles were clearly visible on TEM images (Fig. 2c and 2d) confirming of the uptake of particles by a phagocytic process. Once captured by macrophage podosomes, particles were surrounded by internalization vesicle membranes. Particles showed a cytoplasmic localization in vesicles with a double membrane in agreement with phagolysosomes morphology. Similar results were found for the 250 nm FITC particles (Supplementary Fig. 1).

Confocal imaging and phagocytosis semi-quantification by image analysis

The particles' fluorescence was assessed after a 24 hour incubation with macrophages using an arbitrary ratio of 1000 particles for one cell based on the macrophage size compared to the particles size, in agreement with previous study (Leclerc et al. 2010). Confocal microscopy was used in order to distinguish and quantify entirely engulfed fluorescent particles into acidic vesicles (yellow fluorescence) from those not yet internalized (green fluorescence). The double fluorescent 500 nm FITC/pHrodo particles were detectable in red and green fluorescence spectra, as demonstrated by Fig. 3b and 3c. The merge shown on Fig. 4 allowed us to discriminate external particles (FITC green fluorescence) from particles internalized in acidic vesicles (yellow due to the green FITC and red pHrodoTM probe fluorescence colocalization). Therefore, these pH-sensitive particles in confocal microscopy allowed the discrimination of the particles' compartmentalization (inside/outside) and appeared as a powerful tool to assess the phagocytic process of particles in macrophages. All the appropriate measures were taken to avoid cross-talk between the channels. Same types of results have been observed for 250 nm particles with and without pHrodo (Supplementary Fig. 2).

For phagocytosis quantification, stacks of images obtained by confocal microscopy (green and red fluorescences of the particles) were treated separately with a computer interface and were transposed to grey levels followed by an automatic thresholding algorithm allowing expression of the number of green and red pixels in arbitrary units. Then a ratio was established between red and green pixels leading to a percentage of internalized particles. We found that after a 24 hour incubation, 89 ± 2 % of the 250 nm particles and 86 ± 5 % of the 500 nm particles were internalized. This suggests that there is approximately 10 to 15% of particles remaining attached to cell membranes. Images analysis allowed us to establish a proportion of internalized particles. These data are semi-quantitative, but in good agreement with image observations. This was proved useful for determining the ratio between internalized and external particles.

We found no significant differences of cellular uptake between the two particles sizes investigated (250 and 500 nm). This lack of difference could be due to the 24h time saturation of internalization. To that purpose, different exposure durations such as 6h and 12h should be tested to investigate kinetics of internalization. The same amount of internalization seems to occur independently for the two studied sizes. A larger range of particles sizes should be evaluated to confirm these observations and more particularly use particles under 100nm to compare submicronic particles to nanoparticles uptake process. Moreover various parameters can be modified, e.g. particles/cell ratios or surface group functionalizations. This innovative approach will be of great use for the further investigation of particles cellular uptake quantification.

Recent studies have identified that the size, shape and surface properties are important factors in cellular uptake of nanoparticles (Chithrani, 2011). The surface ligand and charge of particles play an important role in their uptake process as well. The surface of the particles can be coated with different proteins for effective targeting to specific organelles. These data are very important for cancer cells targeting (Subramani et al. 2009, Abedini et al. 2011) or gene delivery field. For example, studies report the generation of “DNA nanoparticles” especially using polycations which enhance the transfection efficiency (Hosseinkhani et al 2006, 2008). Indeed the uptake efficiency

seems significantly affected by the surface charge of the particles: positively charged particles are more internalized than neutral or negatively charged particles (Cho et al. 2009), probably due to the fact that cell membranes are themselves negatively charged. However, interactions with some cell surface molecules may be responsible for the facilitated uptake of negatively charged particles. It is also important to mention that surface charge and size of particles can play a major role in protein conjugation onto particles surfaces and this in turn influences the way the particles interact with cells and tissues.

These findings provide useful information to tailor nano-scale devices at single cell level for effective applications in diagnosis, therapeutics and imaging. It is very important to consider size, shape and surface properties when designing vectors for their applications in biomedical fields. These observations will be taken into account for the development of the FITC-pHrodo particles of different sizes and functionalized with different surface charges.

Toxicity assessment

Finally a toxicological evaluation was performed on macrophages after a 24 hour contact with particles to assess the use of these particles in biological conditions, and more particularly to determine if the incorporation of pHrodoTM in the porous shell of the particle could modify the toxicological data of the native core-shell particles (without the pH probe).

The toxicological parameters investigated in this study are described on Fig. 5. In each case, size equivalent particles (500 nm or 250 nm) were compared for conditions with or without pHrodoTM probe.

Fig. 5a clearly shows a non significant variation in TNF- α production (concentrations expressed in pg/ml) triggered by the incubation with the particles either FITC or FITC/pHrodoTM independently of the tested size. We cannot conclude whether TNF- α production is dependent or not of sizes of the particles because analyses were performed with an equivalent number of particles in each condition, *i.e.* with different volume and surface of particles.

The different amount of released LDH between FITC and FITC/pHrodoTM particles (Fig. 5b) was not significant for 250 nm particles but was significantly enhanced for 500 nm particles.

Concerning the oxidative stress (Fig. 5c and 5d), results indicated no significant variations for the 500 nm and 250 nm particles, irrespective of the presence of pHrodoTM in the porous shell. After a 24 hour exposure total ROS were generated compared to control cells in all tested conditions, probably due to H₂O₂ which are likely the source of other organo-peroxides or lead to formation of hydroxides.

Regarding these toxicological data, the 250 nm particles never showed significant differences between FITC and FITC/pHrodoTM conditions. In this case, incorporation of pHrodoTM in the porous shell of the particle seems to have no significant biological impact. Concerning the 500 nm particles, there were no significant differences regarding the two types of particles except for the LDH parameter (membranes alteration). In this case, only a slight increase was observed for the double fluorescent particles, although this data was significantly lower than the positive control (*i.e.* lysed cells). These results could be explained by the ratio that was used and the porosity of the particles inherent of the FITC/pHrodoTM condition. Indeed, in this study the number dose of particles was fixed at 1000 particles for one cell irrespective of the size of the particle (250 or 500 nm), implicating a different surface area for the two kinds of particles. As a matter of fact, 500 nm particles have a four-fold greater surface, and an eight-fold greater volume than 250 nm particles. Moreover, pHrodoTM is integrated in a porous polysiloxane shell. These two parameters, surface volume and porosity, could explain an increase in membrane alterations (LDH parameter). This assumption is further supported by our semi-quantitative data showing no differences in terms of internalization for the two investigated sizes (89±2% for 250 nm particles *vs.* 86±5% for 500 nm particles). Anyway the double fluorescent particles appeared non toxic for 250 nm size in our experimental conditions *i.e.* 1000/1 cell ratio and efficient to quantify the uptake.

Conclusion

This study aimed at developing a new concept of double fluorescent particles devoted to biological investigations which particularly makes sense for the study of phagocytosis. We presented here a proof of concept validated first in acellular and then in cellular conditions. These particles whose physicochemical characteristics were well defined and controlled (fluorescence, size, surface coating, state of agglomeration) were non toxic regarding different biological parameters particularly for the 250 nm sized ones. This makes this model of particles a powerful tool in biology, one which will be helpful for a better understanding of uptake mechanisms, a key issue of nanotoxicology.

The importance of the physicochemical properties of the particles on biological toxicity is generally described in the literature (Bruch et al. 2004; Clift et al. 2008; Donaldson and Stone 2003; Fubini et al, 2004; Hamilton et al. 2008; Sayes et al 2007; Warheit 2010; Warheit et al. 2007). Further investigations will be conducted with these FITC/pHrodo particles to better understand the impact of the physicochemical properties of the particles on the degree of internalization and the cell reactions. This model of particles allows us to modify one by one all the physicochemical parameters: size, functionalized groups (e.g. carboxylate, amine and polyethylene glycol) indirectly indexed to zeta potential modifications reflecting particles surface charges. A key issue will concern the synthesis of smaller particles at the nanoscale.

Acknowledgements We are grateful to the CMES (Centre de Microscopie Electronique Stéphanois), especially Isabelle Anselme-Bertrand and Charlotte Delorme for the TEM images.

References

- Abedini F, Hosseinkhani H, Ismail M et al (2011) In vitro intracellular trafficking of biodegradable nanoparticles dextran-spermine in cancer cell lines. *Int J Nanotechnol*, 8, 712-723.
- Bos H. and de Souza W (2000) Phagocytosis of yeast: a method for concurrent quantification of binding and internalization using differential interference contrast microscopy. *J Immunol Methods*, 28, 29-43.
- Broz P, Driamov S, Ziegler J et al (2006) Toward intelligent nanosize bioreactors: a pH-switchable, channel-equipped, functional polymer nanocontainer. *Nano Lett*, 6, 2349-2353.
- Bruch J, Rehn S, Rehn B et al (2004) Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 203-216.
- Buck SM, Xu H, Brasuel M et al (2004) Nanoscale probes encapsulated by biologically localized embedding (PEBBLEs) for ion sensing and imaging in live cells. *Talanta*, 63, 41-59.

- Catelas I, Petit A, Marchand R et al (1999) Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles in vitro. *J Bone Joint Surg Br*, 81, 516-521.
- Chithrani DB (2011) Optimization of bio-nano interface using gold nanostructures as a model nanoparticle system. *Insiciences J*, 1(3), 115-135.
- Cho EC, Xie J, Wurm PA et al (2009) Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Lett*, 9, 1080-1084.
- Clark, HA, Kopelman R, Tjalkens R et al (1999) Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 2. Sensors for pH and calcium and the intracellular application of PEBBLE sensors. *Anal Chem*, 71, 4837-4843.
- Clift MJ, Rothen-Rutishauser B, Brown DM et al (2008) The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 232, 418-427.
- De la Harpe J. and Nathan CF (1985) A semi-automated micro-assay for H₂O₂ release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Immunol Methods*, 78, 323-336.
- Di Palma F, Chamson A, Lafage-Proust MH et al (2004) Physiological strains remodel extracellular matrix and cell-cell adhesion in osteoblastic cells cultured on alumina-coated titanium alloy. *Biomaterials*, 25, 2565-2575.
- Donaldson K, Brown D, Clouter A et al (2002) The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med*, 15, 213-220.
- Donaldson K and Stone V (2003) Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita*, 39, 405-410.
- Fizet J, Rivière C, Bridot JL et al (2009) Multi-luminescent hybrid gadolinium oxide nanoparticles as potential cell labeling. In *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, pp. 5717-5725.
- Fubini B (1998) Surface chemistry and quartz hazard. *Ann Occup Hyg*, 42, 521-530.
- Fubini B, Fenoglio I, Ceschino R et al (2004) Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 89-104.
- Fubini B, Ghiazza M and Fenoglio I (2010) Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*, 4, 347-363.
- Griffiths G (2004) On phagosome individuality and membrane signalling networks. *Trends Cell Biol*, 14, 343-351.
- Hamilton RF, Thakur SA and Holian A (2008) Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med*, 44, 1246-1258.
- Harvey BP, Quan TE, Rudenga BJ et al (2008) Editing antigen presentation: antigen transfer between human B lymphocytes and macrophages mediated by class A scavenger receptors. *J Immunol*, 181, 4043-4051.
- Hosseinkhani H and Tabata Y (2006) Self assembly of DNA complexes with polycations for the delivery of genetic materials into cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 6, 1-9.
- Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Gabrielson NP et al (2008) DNA nanoparticles encapsulated in 3D tissue-engineered scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res PartA*, 85A, 47-60.
- Kobayashi S, Kojidani T, Osakada H et al (2010) Artificial induction of autophagy around polystyrene beads in nonphagocytic cells. *Autophagy*, 6, 36-45.
- Leclerc L, Boudard D, Pourchez J et al (2010) Quantification of micro-sized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhal Toxicol*, 22, 1091-1100.
- Lee YE, Smith R and Kopelman R (2009) Nanoparticle PEBBLE sensors in live cells and in vivo. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2, 57-76.
- Miksa M, Komura H, Wu R et al (2009) A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J Immunol Methods*, 342, 71-77.
- Moore NM, Sheppard CL, Barbour TR et al (2008) The effect of endosomal escape peptides on in vitro gene delivery of polyethylene glycol-based vehicles. *J Gene Med*, 10, 1134-1149.
- Munoz Javier A, Kreft O, Semmling M et al (2008) Uptake of Colloidal Polyelectrolyte-Coated Particles and Polyelectrolyte Multilayer Capsules by Living Cells. *Advanced Materials*, 20, 4281-4287.
- Nan A, Bai X, Son SJ, et al (2008) Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes. *Nano Lett*, 8, 2150-2154.
- Oberdorster G, Oberdorster E and Oberdorster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113, 823-839.
- Peng J, He X, Wang K et al (2007) Noninvasive monitoring of intracellular pH change induced by drug stimulation using silica nanoparticle sensors. *Anal Bioanal Chem*, 388, 645-654.
- Reibetanz U, Chen MH, Mutukumaraswamy S et al (2010) Colloidal DNA carriers for direct localization in cell compartments by pH sensing. *Biomacromolecules*, 11, 1779-1784.
- Reibetanz U, Halozan D, Brumen M et al (2007) Flow cytometry of HEK 293T cells interacting with polyelectrolyte multilayer capsules containing fluorescein-labeled poly(acrylic acid) as a pH sensor. *Biomacromolecules*, 8, 1927-1933.
- Romero G, Estrela-Lopis I, Zhou J et al (2010) Surface Engineered Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Intracellular Delivery: Uptake and Cytotoxicity-A Confocal Raman Microscopic Study. *Biomacromolecules*, 11, 2993-2999.

- Sayes CM, Reed KL and Warheit DB (2007) Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci*, 97, 163-180.
- Semmling M, Kreft O, Munoz Javier A et al (2008) A novel flow-cytometry-based assay for cellular uptake studies of polyelectrolyte microcapsules. *Small*, 4, 1763-1768.
- Sjöback R, Nygren J and Kubista M (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A*, 51, L7-L21.
- Skirtach AG, Munoz Javier A, Kreft O et al (2006) Laser-induced release of encapsulated materials inside living cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45, 4612-4617.
- Strunnikova NV, Barb J, Sergeev YV et al (2009) Loss-of-function mutations in Rab escort protein 1 (REP-1) affect intracellular transport in fibroblasts and monocytes of choroideremia patients. *PLoS One*, 4, e8402.
- Subramani K, Hosseinkhani H, Khraisat A et al (2009) Targeting nanoparticles as drug delivery systems for cancer treatment. *Current Nanoscience*, 5, 135-140.
- Van Blaaderen A and Vrij A (1992) Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres. In *Langmuir*, pp. 2921-2931.
- Vieira OV, Bucci C, Harrison RE et al (2003) Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, 23, 2501-2514.
- Wang W, Gu B, Liang L et al (2003) Fabrication of Two- and Three-Dimensional Silica Nanocolloidal Particle Arrays. In *The Journal of Physical Chemistry B*, pp. 3400-3404.
- Warheit DB (2008) How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci*, 101, 183-185.
- Warheit DB (2010) Debunking Some Misconceptions about Nanotoxicology. *Nano Lett*, 4777-4782.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL et al (2004) Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci*, 77, 117-125.
- Warheit DB, Webb, TR, Colvin VL et al (2007) Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci*, 95, 270-280.

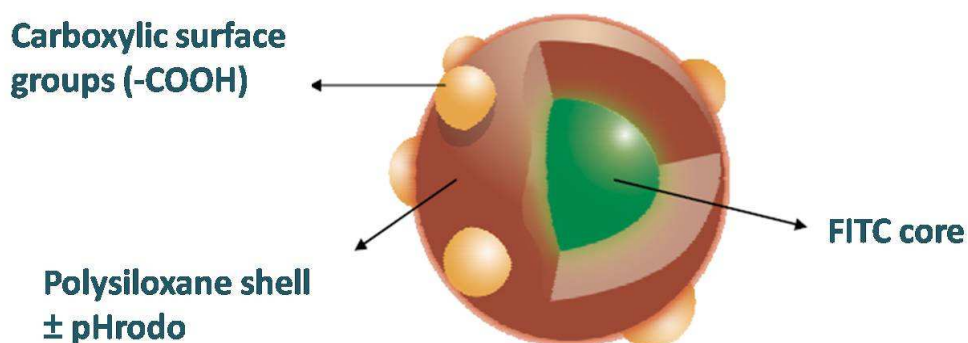


Fig. 1 Schematic representation of the particles developed. Two types were designed: FITC particles (FITC core, polysiloxane shell and COOH surface groups) and FITC/pHrodo particles (FITC core, porous polysiloxane shell functionalized with pHrodoTM probe and COOH surface groups). FITC particles have a single green fluorescence. In acidic conditions FITC/pHrodo particles have a double fluorescence (green for FITC core and red for pHrodoTM probe). FITC (ex: 488 nm; em: 495-550 nm), pHrodoTM (ex: 532 nm; em: 560-650 nm)

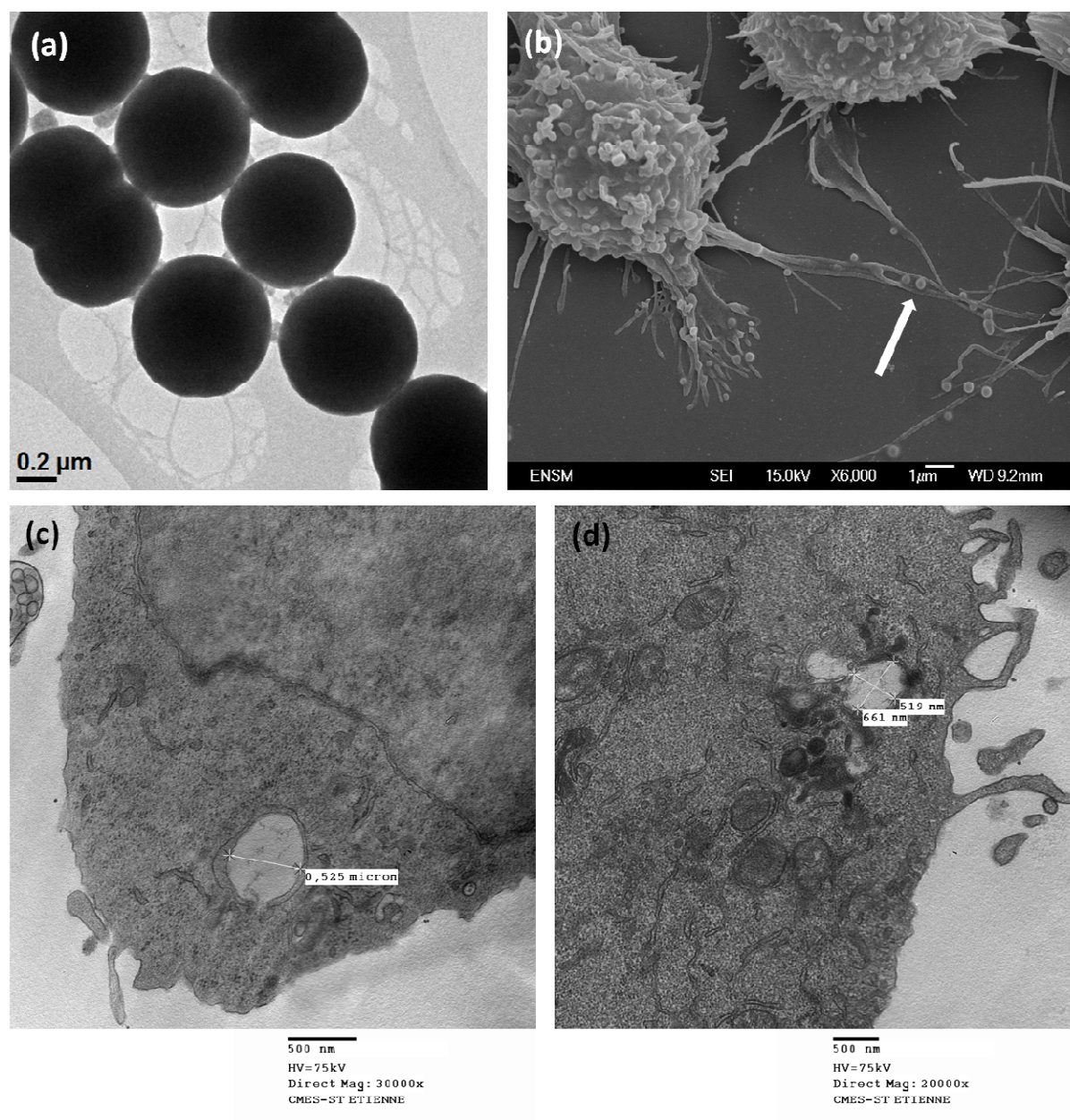


Fig. 2 Electron microscopy observations of 500 nm FITC particles. **a** Transmission Electron Microscopy of particles alone, **b** Scanning Electron Microscopy after a 24 hour contact with macrophages RAW 264.7 and **c, d** Transmission Electron Microscopy after a 24 hour contact with macrophages RAW 264.7 (HV = 75 kV)

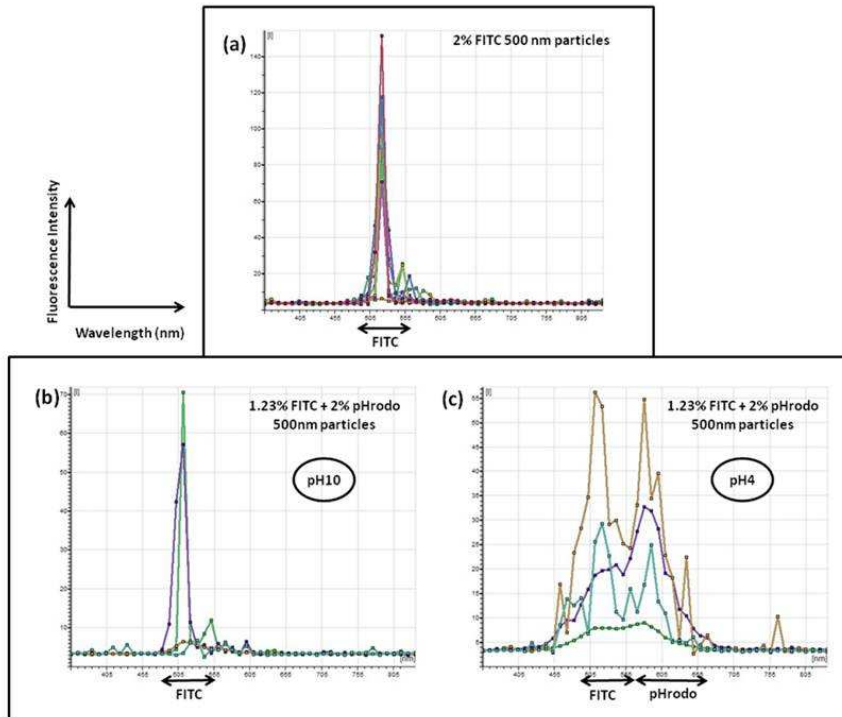


Fig. 3 Fluorescent spectra acquired by confocal microscopy in acellular conditions for 500 nm 2% FITC particles (a) and for 1.23% FITC / 2% pHrodoTM particles at pH10 (b) and pH4 (c). Intensity of pHrodoTM fluorescence increases as pH acidifies. A mild FITC fluorescence intensity decrease is observed between the two types of particles. Each curve corresponds to different regions of interest positioned on image stacks acquired during the confocal spectra scan

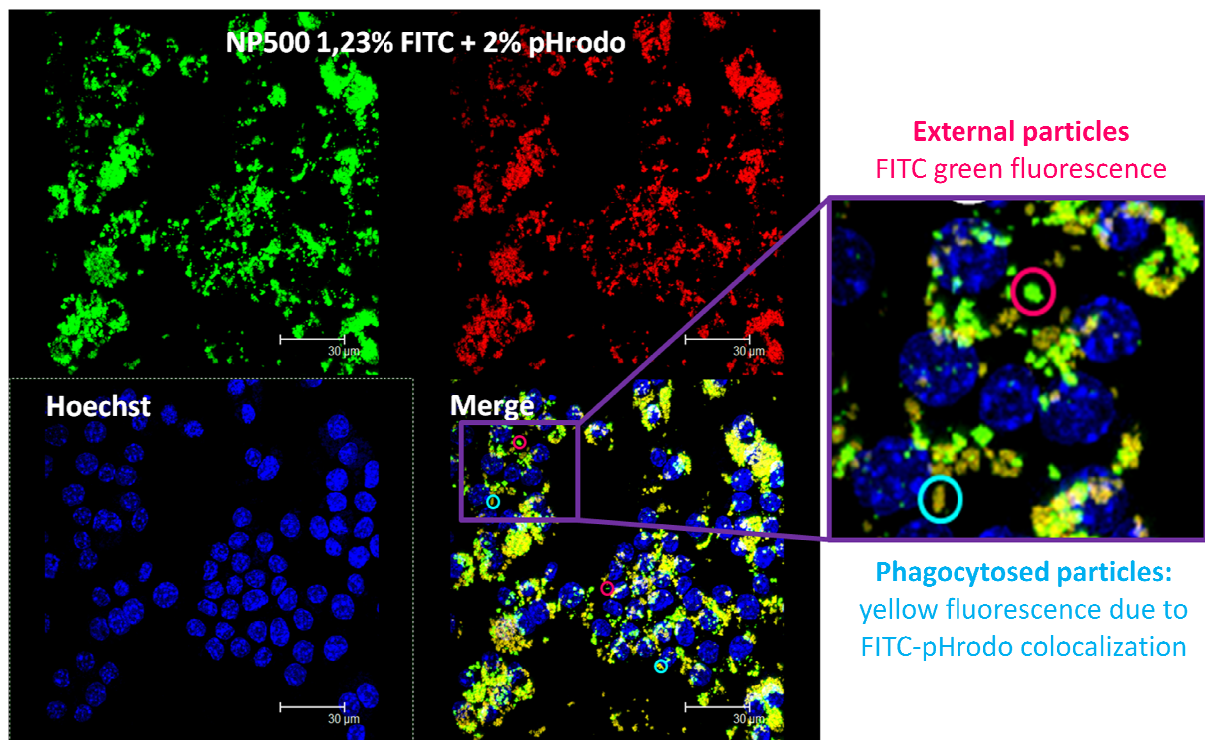


Fig. 4 Example of confocal microscopy acquisition of 500 nm FITC/pHrodo particles after a 24 hour contact with RAW 264.7 macrophages. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). The enlargement allows the distinction between external particles (green) and phagocytosed particles (yellow due to the merge of green and red fluorescences). FITC (ex: 488 nm; em: 495-550 nm), pHrodoTM (ex: 532 nm; em: 560-650 nm) and Hoechst (ex: 350 nm; em: 408-443 nm)

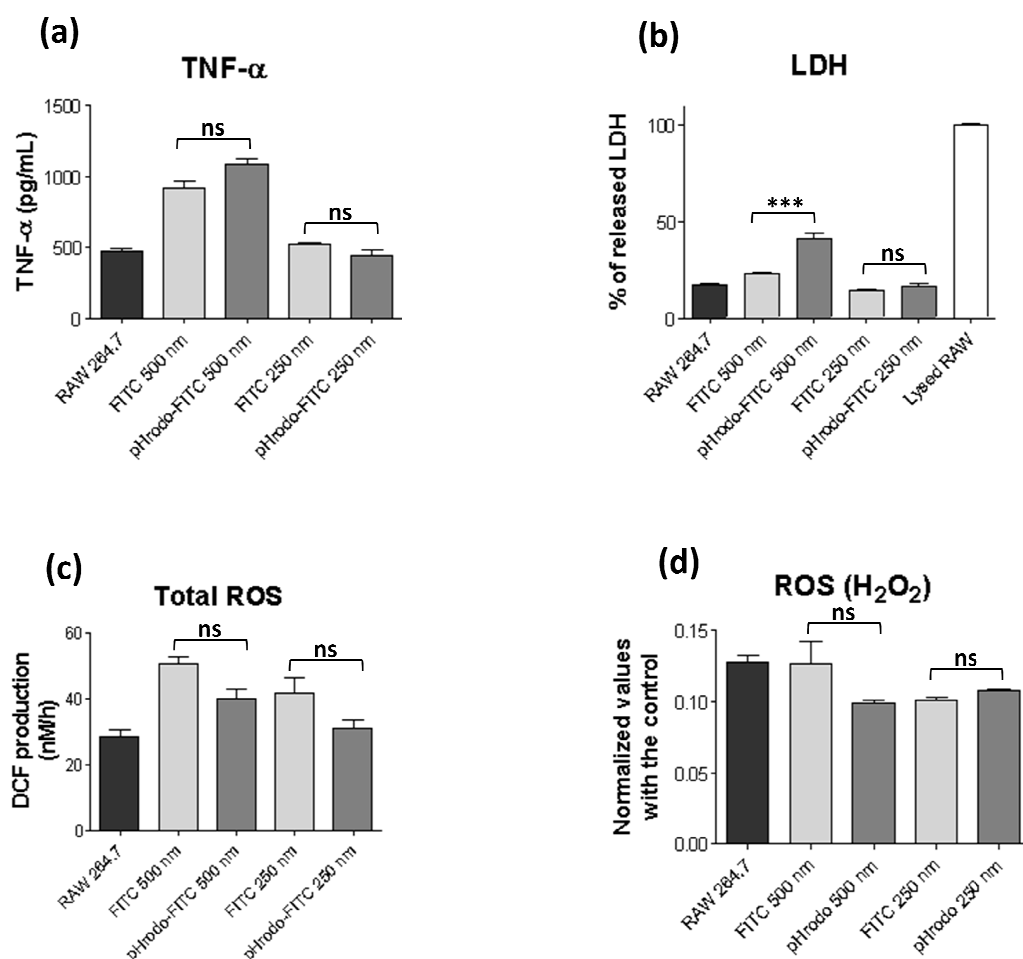
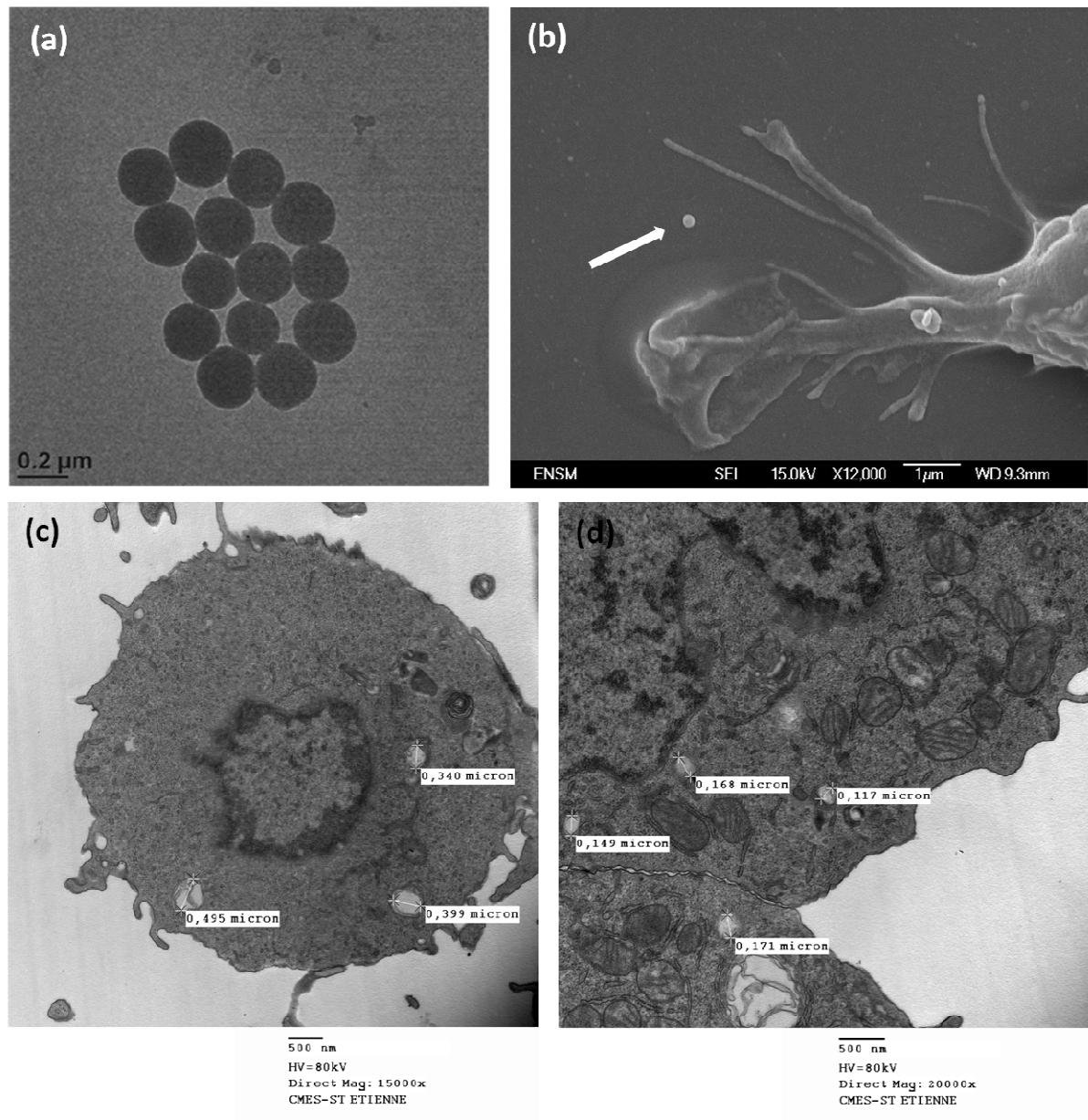


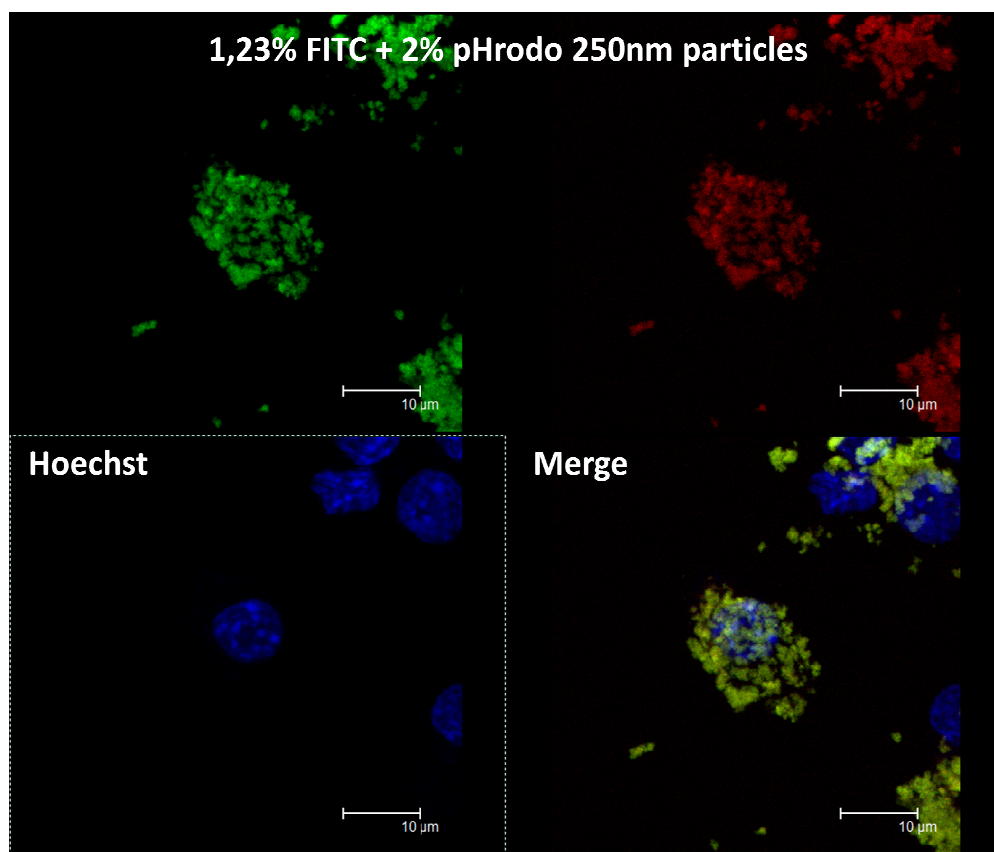
Fig. 5 Toxicological analysis of single or double fluorescent particles (FITC or FITC/pHrodoTM particles) for 500 or 250 nm respectively incubated with RAW 264.7 cells for 24 hours (1000 particles/cell). **a** TNF- α production, **b** percentage of released LDH, **c** total ROS generated and **d** H₂O₂ produced (n=3, *p<0.05)

Table 1 Particles size evaluated by TEM and size distribution – zeta potential measured by DLS for particles in water or in complete culture media

Particles types and expected sizes	Size characterization (nm)			Zeta Potential	
	TEM	DLS - Water	DLS - Culture media	Water	Culture media
FITC particles - 500 nm	411±23	434±11	492±6	-65,6±0,3	-22,6±2,2
FITC/pHrodo particles - 500 nm	492±19	512±6	514±8	-57,6±0,5	-16,2±0,7
FITC particles - 250 nm	240±17	269±10	279±4	-54,5±0,9	-24,5±1,5
pHrodo/FITC particles - 250 nm	224±15	307±9	232±2	-53,4±1,7	-19±0,7



Supplementary Fig. 1 Electron microscopy observations of 250 nm FITC particles. **a** Transmission Electron Microscopy of particles alone, **b** Scanning Electron Microscopy after a 24 hour contact with macrophages RAW 264.7 and **c**, **d** Transmission Electron Microscopy after a 24 hour contact with macrophages RAW 264.7 (HV = 80 kV)



Supplementary Fig. 2 Example of confocal microscopy acquisition of 250 nm FITC/pHrodo particles after a 24 hour contact with RAW 264.7 macrophages. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Distinction is observed between external particles (green) and phagocytosed particles (yellow due to the merge of green and red fluorescences). FITC (ex: 488 nm; em: 495-550 nm), pHrodoTM (ex: 532 nm; em: 560-650 nm) and Hoechst (ex: 350 nm; em: 408-443 nm)

Particles suspensions	Expected sizes (nm)	% FITC	% pHrodo	FITC bleaching	pHrodo bleaching
FITC	500	1,23 %	0,0%	--	*
FITC	500	3%	0,0%	---	*
FITC	500	5%	0,0%	---	*
FITC	250	2%	0,0%	---	*
FITC	250	3%	0,0%	---	*
FITC/pHrodo	500	2%	< 0,5%	---	+++
FITC/pHrodo	500	1,23 %	0,5%	--	+
FITC/pHrodo	500	1,23 %	2,0%	--	-
FITC/pHrodo	250	2%	0,1%	---	+++
FITC/pHrodo	250	2%	0,2%	---	+++
FITC/pHrodo	250	2%	0,3%	---	++
FITC/pHrodo	250	2%	0,5%	---	+
FITC/pHrodo	250	1,23 %	0,5%	--	+
FITC/pHrodo	250	1,23 %	2,0%	--	-

Supplementary Table. Fluorescence optimisation of dye amount. The FITC or pHrodo photobleaching was assessed under the confocal beam. Bleaching: low(+) high(++) strong(+++) or no bleaching low(-) high(--) strong(---) were estimated for the two sizes of particles. The best yield was obtained for 1,23% FITC and 2% pHrodo

II.3 Observations microscopiques complémentaires

Des observations morphologiques au microscope photonique ont été systématiquement faites afin d'une part de vérifier la qualité du matériel cellulaire et observer les éventuelles modifications morphologiques consécutives aux interactions cellules-particules. Ces analyses ont été effectuées après cyto-centrifugation sur lame et coloration MGG (**Figure 54**). Cette approche a permis de vérifier la qualité des suspensions cellulaires. Ainsi nous avons noté une déformabilité cellulaire avec aspect « bourgeonnant » de la membrane dans le cas des plus grosses nanoparticules.

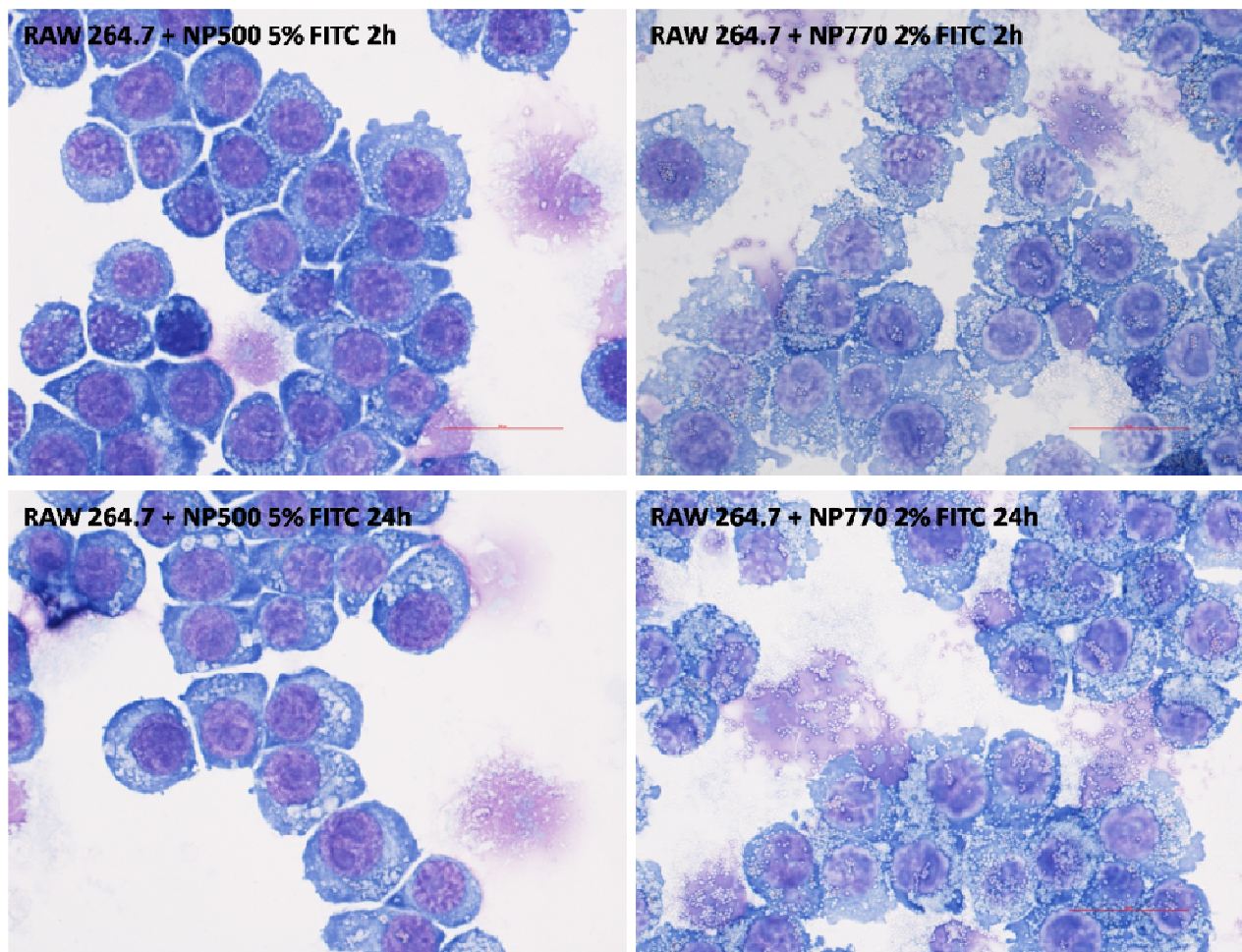


Figure 54 : Images réalisées en microscopie photonique après coloration cytologique par la méthode de MGG sur des macrophages de la lignée RAW 264.7 mises en contact 2h ou 24h avec des NP500 5% FITC et NP770 2% FITC (Objectif x60).

Avant de commencer les analyses en microscopie confocale, les premières observations ont été réalisées en microscopie à épifluorescence après contact des nanoparticules avec les macrophages et marquage des noyaux au Hoechst (**Figure 55**).

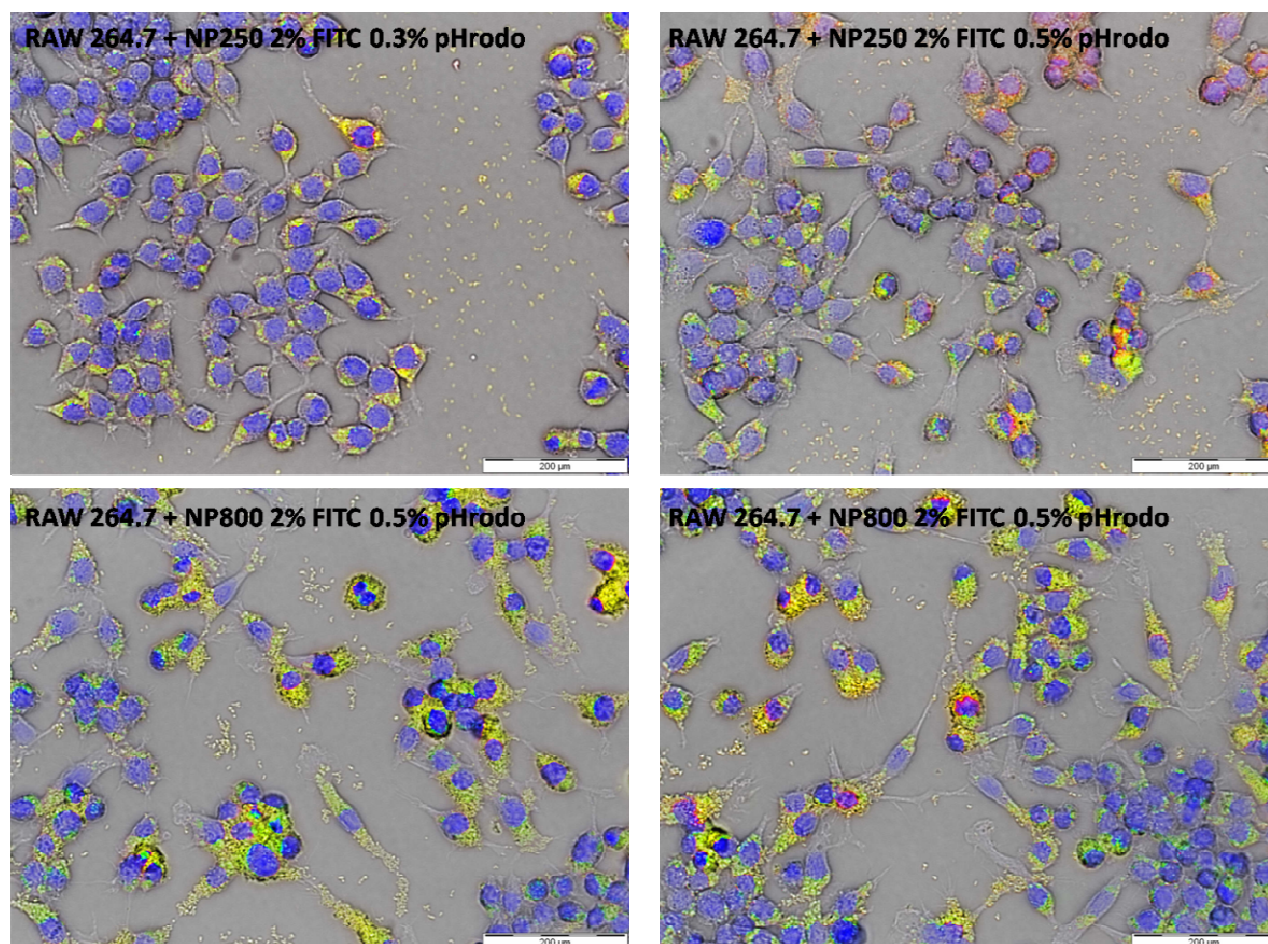


Figure 55 : Exemples de NP250 et NP800 2% FITC + 0,3 ou 0,5% de pHrodo en microscopie à épifluorescence après contact de 2h avec des macrophages RAW 264.7 (Objectif x40).

Ces images avaient dans un premier temps permis de confirmer les modifications du signal fluorescent à la base du principe de la sonde pHrodo™.

Les nanoparticules développées mais dites de « type classique » soit sans pHrodo ont aussi été observées en microscopie confocale après marquage du cortex sous-membranaire d'actine à la phalloïdine et marquage des noyaux au Hoechst. Ces images de bonne qualité ont rejoint les observations déjà développées pour les particules micrométriques concernant la distinction intracellulaire. A titre d'exemple voici deux types de nanoparticules de tailles différentes ainsi que leurs spectres de fluorescence (**Figure 56 ; Figure 57**).

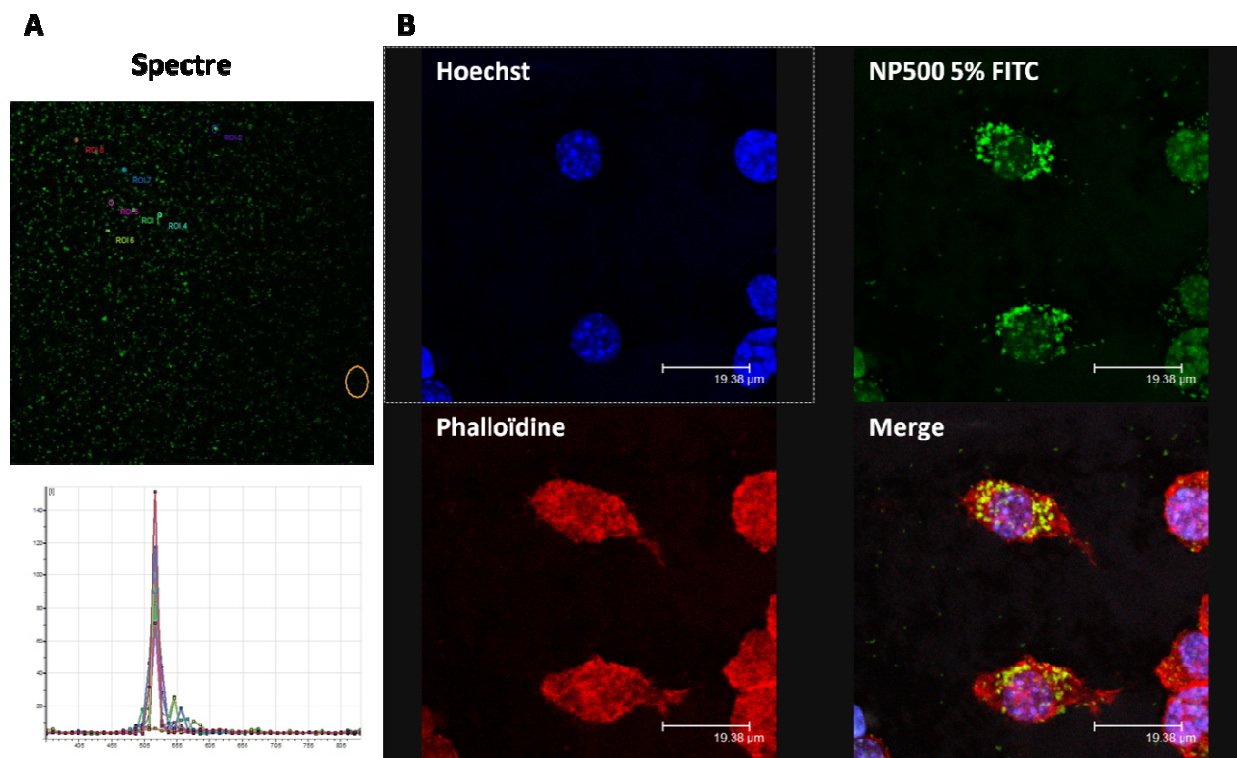


Figure 56 : (A) Spectre de fluorescence de NP500 5% FITC (lot 181.09). (B) Observation en microscopie confocale de macrophages RAW 264.7 après contact de 24h avec des NP500 5% FITC (lot 181.09).

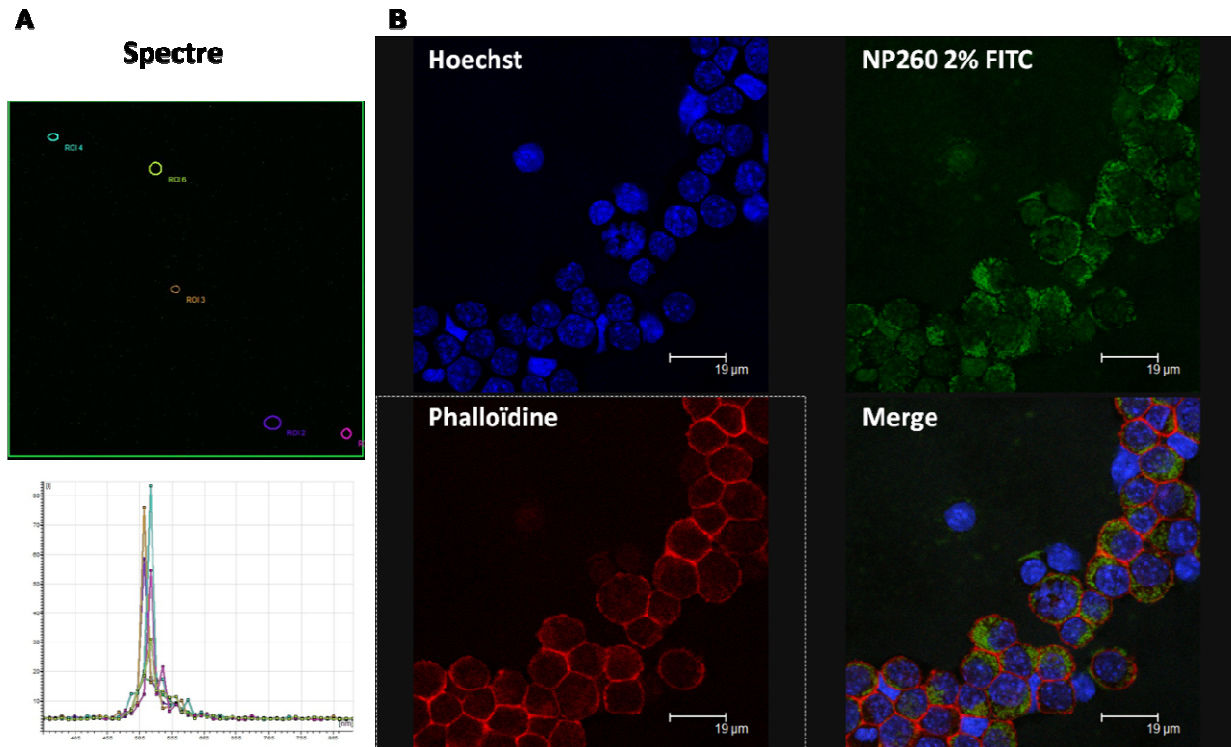


Figure 57 : (A) Spectre de fluorescence de NP260 2% FITC (lot 212.09). (B) Observation en microscopie confocale de macrophages RAW 264.7 après contact de 24h avec des NP260 2% FITC (lot 212.09).

Voici enfin en microscopie confocale, quelques illustrations supplémentaires des nanoparticules pHrodo (**Figure 58**). Les différentes fluorescences (FITC, pHrodo et Hoechst) ont correctement été identifiées et comparées. De plus, l'observation de noyaux cellulaires en mitose a constitué un bon indicateur de l'état général des macrophages.

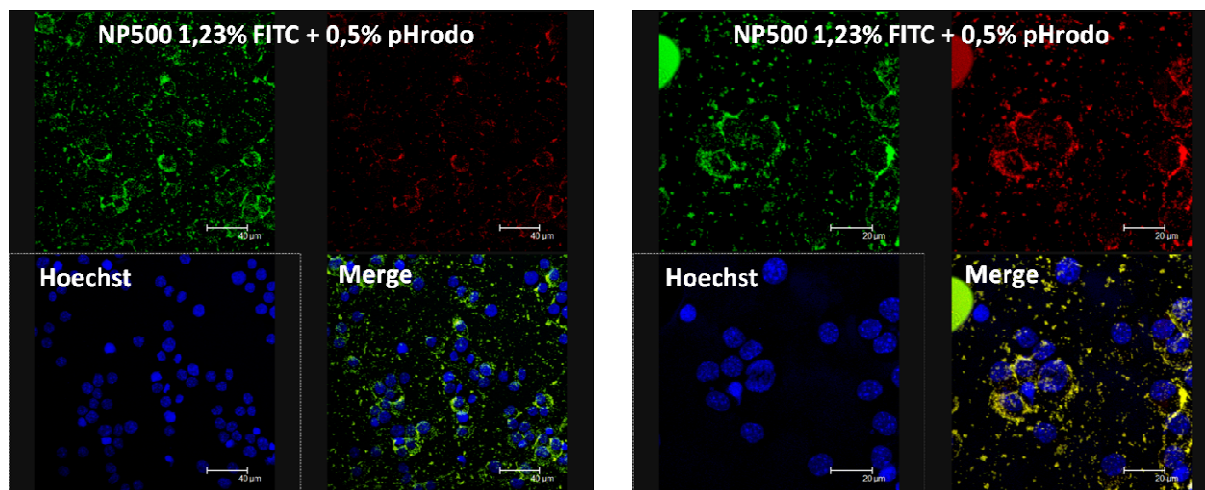


Figure 58 : Observation en microscopie confocale de macrophages RAW 264.7 après contact de 24h avec des NP500 1,23% FITC + 0,5% pHrodo.

II.4 Bilan sur l'internalisation des particules nanométriques doublement fluorescentes

Les travaux développés avec Nano-H ont permis de créer un outil de quantification adapté à notre problématique d'évaluation de l'internalisation cellulaire des nanoparticules. Différentes techniques telles que la DLS, la MEB, la MET et la microscopie confocale nous ont permis de valider notre concept de nanoparticules doublement fluorescentes en termes de taille, forme, charge de surface et fluorescence.

Pour les nanoparticules présentant une double fluorescence (FITC et pHrodo) l'ajustement entre le pourcentage massique des deux types de fluorescence a été difficile à obtenir et pourrait encore être optimisé, mais l'efficacité de ce modèle de particules a été validé par la réalisation des spectres de microscopie confocale. En effet, nous avons bien observé plus particulièrement en microscopie confocale que la fluorescence rouge du pHrodo apparaissait bien en condition acide conduisant à une fluorescence jaune (par superposition à la fluorescence FITC) quantifiable représentative d'une colocalisation des NP dans les phagolysosomes. Ainsi, après analyse d'image, $89 \pm 2\%$ des nanoparticules de 250 nm apparaissent internalisées dans des vésicules acides après 24 heures de contact avec les macrophages (l'excédent de nanoparticules non internalisées et non adhérentes à la membrane cellulaire a été au préalable éliminé par rinçage). Pour les nanoparticules de 500 nm, nous avons quantifié $86 \pm 5\%$ de nanoparticules internalisées. Ces pourcentages ont été obtenus après analyse de la fluorescence sur les images de microscopie confocale obtenues après un contact de 24 heures entre les nanoparticules et les macrophages.

L'avantage de ce modèle original réside dans le fait que la chimie de surface de la nanoparticules n'est pas modifiée contrairement à d'autres études (**Serda et al., 2009b**). En effet, la FITC est au cœur de la nanoparticule et le pHrodo dans une couche poreuse. Ainsi ces nanoparticules pourront *in fine* être adaptées en termes de taille et de chimie de surface qui sont des paramètres déterminant pour des analyses ultérieures d'internalisation (**Lundqvist et al., 2008**).

Enfin nous avons aussi évalué l'impact de ces nanoparticules au niveau cellulaire avec les mêmes paramètres que ceux présentés lors de la première étude (LDH, TNF- α et ROS). Il est apparu que l'ajout de pHrodo dans l'enveloppe de polysiloxane ne modifie pas significativement les données biologiques de toxicité de ces nanoparticules.

III. Impact des paramètres physico-chimiques des nanoparticules sur leur internalisation

La suite des travaux a concerné, en parallèle des mises au point des nanoparticules doublement fluorescentes, l'établissement d'une gamme de nanoparticules de tailles et de charges de surface différentes (positive, négative et neutre) selon le procédé de synthèse utilisé par la société Nano-H pour les nanoparticules classiques FITC. A ce stade de l'étude, les nanoparticules classiques (FITC seules) présentant une fluorescence de 2% en masse apparaissent comme le meilleur choix de modèle d'analyse qui satisfasse les différents types d'applications.

L'objectif principal de cette partie réside dans une meilleure compréhension de l'effet de la taille et de la charge des nanoparticules sur le processus d'internalisation et de toxicité après 24h de contact avec des macrophages RAW 264.7.

Des caractérisations complémentaires en MET ont pu être développées dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire MATEIS de l'INSA de Lyon (Thèse de Wael Rima).

III.1 Impact du paramètre taille des nanoparticules

La société Nano-H a produit une gamme de nanoparticules-FITC de taille variable fonctionnalisées avec des groupements COOH, afin d'évaluer l'influence de la dimension sur l'internalisation et la réponse biologique dans des macrophages.

Le détail de cette gamme de nanoparticules en termes de taille, fluorescence, groupements de surface et concentration est récapitulé dans le *Tableau 8*.

Particules (H ₂ O pH 9)	Lot	Date	Taille attendue (nm)	DLS (nm)	% FITC	Fonction surface	Volume (mL)	Nombre de particules théorique/mL (6 mL)
classique	120-10	01/10/2010	150	139 ± 2	3%	COOH	6	2,9 * 10 ¹³
classique	121-10	01/10/2010	250	252 ± 4	3%	COOH	6	8,2 * 10 ¹²
classique	122-10	01/10/2010	500	492 ± 6	3%	COOH	6	9,45 * 10 ¹¹
classique	123-10	01/10/2010	850	847 ± 19	3%	COOH	6	2,1 * 10 ¹¹

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des nanoparticules-FITC de tailles différentes.

Les paramètres physico-chimiques des nanoparticules ont dans un premier temps été caractérisés. Leur taille a été contrôlée en DLS (eau et milieu de culture) et en TEM, leur potentiel zêta (*ANNEXE II.4.2*) a aussi été évalué en DLS (eau et milieu de culture) et la fluorescence de la FITC a été vérifiée au niveau spectral.

La suite des analyses a été réalisée après 24 heures de contact entre ces différents types de nanoparticules et notre lignée de macrophages. L'internalisation des nanoparticules a été visualisée en microscopie confocale et électronique puis quantifiée grâce à la technique de fluorimétrie couplée au quenching au bleu trypan exposé dans le premier chapitre de cette thèse. La fluorimétrie s'est avérée plus pertinente à ce stade de l'étude car celle-ci nous a permis de raisonner en nombre de nanoparticules internalisées plutôt qu'en pourcentage de cellules phagocytantes quantifiable en CMF comme dans la première partie de ces travaux. La

quantification ainsi établie a ensuite été corrélée aux analyses biologiques de toxicité telles qu'elles ont été précédemment décrites.

La quantification de la phagocytose en fluorimétrie a été réalisée avec un fluorimètre Fluoroskan Ascent (Thermolabsystem) avec le couple de longueur d'onde excitation/émission fixé à 485/538 nm correspondant à la FITC. Ces analyses se sont basées sur le même principe que la CMF en utilisant un quenching au BT pour distinguer les particules adhérentes à la membrane et internalisées. De plus, au cours de chaque expérience, une gamme étalon (1500, 1000, 750, 500 et 250 nanoparticules/cellule) était réalisée pour chaque type de nanoparticules utilisées ce qui nous a permis d'exprimer les résultats en nombre de nanoparticules internalisées par cellule. Les mesures ont été effectuées à t0 puis après 24 d'incubation (avec et sans BT). La **Figure 59** présente un exemple de courbe étalon obtenue pour un type de particules (lot 123-10 – 850 nm).

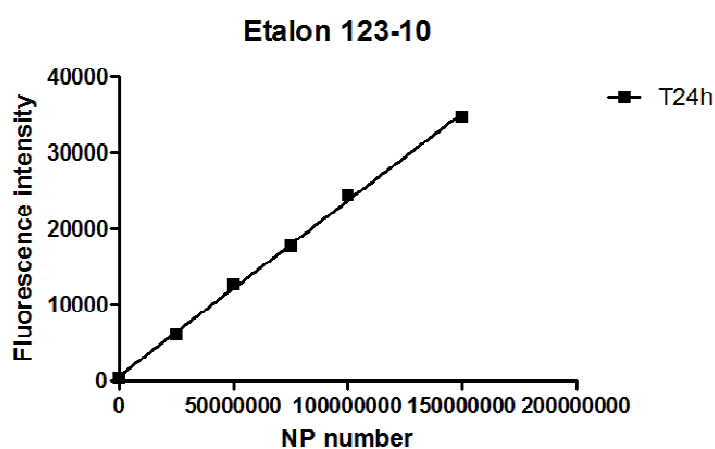


Figure 59 : Exemple de courbe étalon obtenue après analyse de la fluorescence en fluorimétrie (n=4).

Enfin dans cette étude, nous avons complété la quantification en fluorescence avec une quantification chimique de la silice qui compose nos nanoparticules (**Cho et al., 2009**).

Nous avons utilisé la technique d'ICP-AES (Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif) qui permet de doser des espèces chimiques présentes en faible quantité dans un échantillon et de déterminer ainsi les impuretés présentes. L'échantillon à analyser subit au préalable une dissolution avec de l'acide nitrique et de l'acide chlorhydrique.

L'appareillage est composé comme suit (**Figure 60**) :

- Une source de nébulisation/atomisation/excitation de l'échantillon; elle comprend générateur, torche et nébuliseur.
- Un dispositif dispersif (monochromateur et/ou polychromateur) pour analyser le rayonnement émis par l'échantillon.
- Un ensemble électronique/informatique pour la gestion des spectromètres et l'exploitation des données.

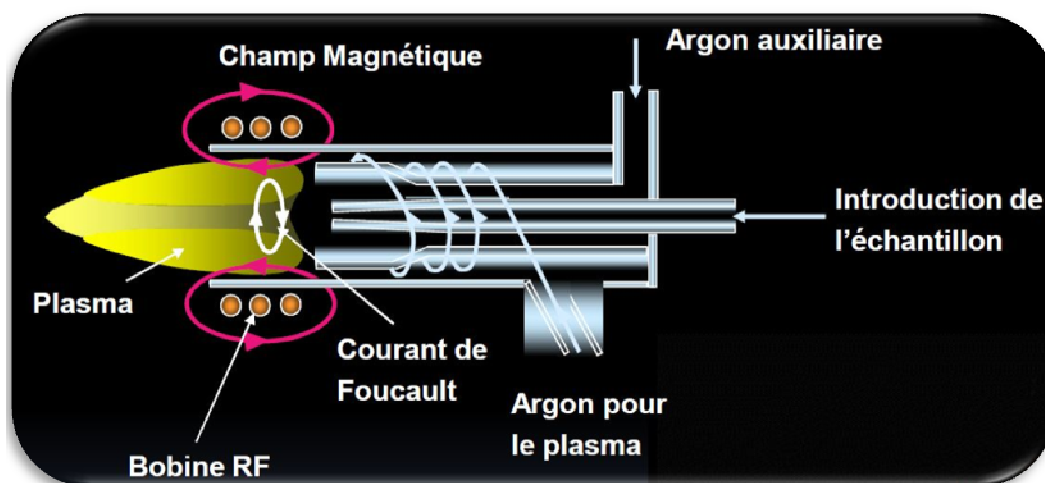


Figure 60 : Schéma d'une torche à plasma dans un appareillage de spectroscopie d'absorption atomique (didel.script.univ-paris-diderot.fr).

L'échantillon liquide est prélevé, nébulisé puis transmis vers le plasma. Il subit les différentes étapes de décomposition, d'atomisation, d'ionisation : les atomes et ions émis sont alors excités. L'intensité des raies émises par ces espèces, lors de leur retour vers leurs niveaux d'énergie fondamentaux est mesurée. Le plasma est un gaz (argon) partiellement ionisé et macroscopiquement neutre. La haute température (6000-10.000°C) générée permet d'éliminer les interférences chimiques, et rend accessible à la fois les raies ioniques et atomiques. L'acquisition de tels spectres nécessite une haute précision.

Dans ces travaux, nous avons utilisé la technique d'ICP après contact cellules/nanoparticules de façon à quantifier la quantité de silice présente (t0 et t24h après rinçage).

Ces travaux sont détaillés dans la publication suivante en cours de finalisation pour soumission à la revue *Inhalation Toxicology*.

III.1.1 Publication 3 – A soumettre

Size effect of fluorescent nanoparticles on uptake by macrophages and *in vitro* biological activity

Name and affiliation of each author:

L. LECLERC^{1,2,3}, W. RIMA⁴, D. BOUDARD^{1,5,6}, J. POURCHEZ^{1,2}, V. FOREST^{1,2}, V. BIN^{1,5}, P. MOWAT⁷, P. PERRIAT⁴, P. GROSSEAU², D. BERNACHE-ASSOLLANT^{1,2,3}, M. COTTIER^{1,5,6}.

¹LINA, Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées, EA 4624, F-42023, Saint-Etienne, France

²Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Centre Ingénierie et Santé, F-42023, Saint-Etienne, France

³Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, LPMG, FRE 3312 CNRS, F-42023, Saint-Etienne, France

⁴MATEIS, Université de Lyon, INSA-Lyon, F-69621, Villeurbanne, France.

⁵Université de Saint-Etienne, Jean Monnet, Faculté de Médecine, F-42023, Saint-Etienne, France

⁶CHU de Saint-Etienne, Laboratoire d'Histologie, F-42055, Saint-Etienne, France

⁷LPCML, UMR 5620 CNRS, Université de Lyon, Université Claude Bernard, F-69622, Villeurbanne, France

Running headline: Nanoparticles size effect.

Complete contact information:

Lara LECLERC

Centre Ingénierie et Santé

IFR INSERM 143 – CNRS LPMG FRE 3312

École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

158, Cours Fauriel - 42023 Saint-Etienne Cedex 2, France

LINA – EA 4624

E-mail : leclerc@emse.fr

Tel: (+33) 4 77 42 14 25 Fax: (+33) 4 77 42 14 89

ABSTRACT AND KEY TERMS

Background: The use of nanometric particles is in full expansion but they may exhibit variable toxicity levels depending on their physicochemical characteristics. We focused our attention on macrophages, the main target cells of the respiratory system responsible for the phagocytosis of the particles. The aim of this study was to determine the impact of the size parameter on cellular uptake and biological activity, working with well-characterized fluorescent nanoparticles (NP).

Methods: Fluorescent silica (Si) particles of variable submicronic sizes (850, 500, 250 and 150 nm) but with same surface coating (COOH) were tailored and physico-chemically characterized. These NP were then incubated with the RAW 264.7 macrophages cell line. After microscopic observations (SEM, TEM, confocal), we proposed two methodologies leading to a quantitative evaluation of the NP uptake. The first one was based on the fluorescent detection with trypan blue which allows to distinguish entirely engulfed fluorescent particles from those just adherent to the cell membrane and to quantify them. The second one was based on the Si content evaluation, chemically evaluated using the ICP dosage method without requiring fluorescence property. Finally, all data were compared to the *in vitro* toxicity assessed in terms of different parameters (LDH release, TNF- α and ROS production).

Results and conclusion:

NP were well characterized (spectral properties, size distribution, zeta potential, agglomeration state and chemical surface groups) and easily visualized after cellular uptake using confocal and electron microscopy. The quantification techniques were developed to precisely evaluate the number of internalized NP and a multiparametric approach seems suitable. The size parameter was important regarding uptake and *in vitro* toxicity evaluations but strongly depends of the NP doses employed.

Key terms: Uptake quantification of nanoparticles, macrophages, fluorescent nanoparticles, *in vitro* toxicity evaluations.

INTRODUCTION

The toxicological assessment of fine and ultrafine particles (and particularly engineered nanoparticles) represents a considerable current issue for environmental science, biosciences or nanomedicine (Oberdorster et al., 2005, Warheit et al., 2004, Sayes et al., 2007). In order to improve our knowledge of submicronic particles biological toxicity and uptake mechanisms, it seems of high interest to determine the amount of internalized particles into the cells after exposure (Haberzettl et al., 2007, Clift et al., 2008). Different particle entry pathways exist in the organism: skin, gastro-intestinal tract, respiratory tract or by injection. We particularly focus our attention on the respiratory way and its main target cells: the macrophages (MA). These latter are the main actors of phagocytosis, a highly conserved complex process, classically defined as the internalization and destruction of particles greater than 0.5 μm in size. It is a receptor-mediated and actin-driven process: phagocytic uptake involves actin dynamics including polymerization, bundling, contraction, severing and depolymerization of actin filaments (Ravetch and Aderem, 2007, Fenteany and Glogauer, 2004, Aderem and Underhill, 1999, Niedergang and Chavrier, 2005, Niedergang and Chavrier, 2004).

The physicochemical characteristics of the particles surface may influence the phagocytic process (Serda et al., 2009b) and they have also been shown to be involved into toxicological processes (Fubini, 1998, Fubini et al., 2004, Clift et al., 2008). It appears of great interest to establish the relationship between the quantification of the uptake and the biotoxicity of the nanoparticles depending on their physicochemical features (size, surface reactivity, etc.).

Different studies have investigated the impact of nanoparticles size on cellular uptake but with various types of NP with not fully characterized physico-chemical parameters or agglomeration state (Rejman et al., 2004). Moreover little attention has been paid to a precise quantification process with just a simple fluorescence quantification (Hu et al., 2007, Su et al., 2010, Yan et al., 2010). In most cases, the only parameter of mean fluorescence intensity has been taken into account as uptake quantification. Sometimes uptake is just visualized with microscopy techniques

and not quantified at all (Song et al., 2010). The study of NP uptake generally remains qualitative or semi-quantitative.

In this paper, we focused on the impact of the NP size on their cellular uptake and level of toxicity. First we synthesized silicon fluorescent NP with well controlled features (size, chemical surface groups, fluorescence, shape, zeta potential, etc.) of four different sizes (150, 250, 500 and 850 nm). The physicochemical properties of these NP were validated in cell free conditions using usual techniques: Diffusion Light Scattering (DLS), zeta potential measurement, confocal microscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM).

Then NP were incubated with a MA cell line (RAW 264.7) and their cellular uptake and subcellular localization were observed using confocal microscopy and TEM. However these techniques did not allow an accurate quantification of the phagocytic process. To precisely quantify the amount of internalized NP we used two methods. The first one allows fluorescent detection of NP with a trypan blue (TB) quenching by fluorimetry. In addition to its principal function as an exclusion dye of dead cells, TB is known for its ability to "turn off" the green fluorescence emitted by the particles outside the cells. This process allowed us to distinguish internalized NP from those just adhering to the plasma membrane (Hed et al., 1987, Nuutila and Lilius, 2005, Van Amersfoort and Van Strijp, 1994, Thiele et al., 2001). The second method is based on the dosage of a chemical component specific of the NP (*i.e.* Si). The silicon was quantified by an Induced Coupled Plasma (ICP) technique in order to compare and validate data (Cho et al., 2009).

Moreover the toxicity of particles was evaluated regarding several complementary parameters: Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) production (to assess the inflammatory response), Lactate Dehydrogenase (LDH) release (reflecting integrity of the cell membrane) and the production of different Reactive Oxygen Species (ROS) (Donaldson et al., 2002, Catelas et al., 1999, Bruch et

al., 2004, Sayes et al., 2007). This part aimed at assessing if the different sizes of NP had a major impact on the level of toxicity.

In this paper, we exposed an appropriate and precise methodology to investigate the relationship between NP size, capacity of cellular uptake and the induced toxicity.

MATERIAL AND METHODS

Fluorescent silica-based nanoparticles

Synthesis

Four types of fluorescent silica-based NP with variable and well-characterized sizes (150, 250, 500 and 850 nm) were produced (Nano-H company, France). The NP were constituted of silica core doped with Fluoresceine isothiocyanate Isomere I ($C_{21}H_{11}NO_5S$, FITC, $\geq 90\%$, Sigma-Aldrich) exhibiting a green fluorescence and grafted by covalently bonds, as well-described in the literature (Van Blaaderen and Vrij, 1992, Wang et al., 2003). Then a controlled polysiloxane shell (SiO_x) was introduced, by hydrolysis condensation of 3-aminopropyl triethoxysilane ($H_2N(CH_2)_3-Si(OC_2H_5)_3$, APTES, 99%, Sigma-Aldrich) and tetraethyl orthosilicate ($Si(OC_2H_5)_4$, TEOS, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) using alcohol as solvent in presence of catalytic agent. Finally NP were stabilized by introducing carboxylic surface groups (COOH) onto the surface using diethylenetriamine pentaacetic dianhydride DTPA-ba (TCI Europe) as reagent. The synthesis was realized as follows: a solution of DTPA-ba was stirred and added to the colloid solution containing nanoparticles at room temperature. Then the final solution was purified by centrifugation and redispersed in ethanol. NP were then redispersed in water at a desired concentration (particles number/mL). NP fluorescence (% m/m SiO_2) was fixed to 3% as optimized in a previous study. Excitation and emission wavelengths of the FITC were 488 nm and 495-550 nm respectively.

Physico-chemical characterization

Diffusion light scattering (DLS) and zeta potential measurement

Measurement of the size distribution of the different NP and their zeta potential were performed on a Zetasizer Nano S from Malvern instrument (Orsay, France) in water and in complete culture media (DMEMc, precisely defined in the macrophage cell culture section) after strong vortexing (n=3). Nanoparticles agglomeration was also followed in complete culture media after 8 and 24 hours.

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscope (TEM) images were obtained on a JEOL 2010F FEG microscope at an accelerating voltage of 200 kV. Samples were prepared by dropping sample suspension onto a carbon-coated holey film supported on a 3 mm mesh copper grid.

Fluorescence spectral analysis

Spectral measurements of NP suspensions were acquired with an excitation wavelength of 490 nm and emission fluorescence spectral curves were collected over the 490-800 nm wavelength range (Fluorescence spectrophotometer F-2500, Hitachi).

Cellular assay

Macrophage cell culture and dose of NP

The RAW 264.7 cell line was provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem LGC, Molsheim, France) and derives from mice peritoneal macrophages transformed by the AMLV (Abelson Murine Leukemia Virus). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen), complemented with 10% of fetal calf serum (FCS, Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (penicillin 10 000 units/mL, streptomycin 10 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and incubated at 37°C under a 5% carbon dioxide humidified atmosphere.

For each experiment, an arbitrary ratio of 1000 NP for one cell based on the macrophage size compared to NP sizes was used and incubated 24 hours with macrophages.

Confocal imaging after cellular fluorescent labelings

Cells were grown in 6 well plates (1 million cells in 4 mL) containing coverslips and NP were incubated for 24 hours. After the particle exposure, the coverslips were fixed into wells with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes. The wells were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS, VWR, Fontenay sous bois, France) to remove NP that did not adhered to cell membrane or

were not internalized. Then, actin cytoskeleton was labeled with AlexaFluor® 594 phalloidin (Invitrogen; diluted 1:40 in PBS) for 20 min and rinsed with PBS. Finally cell nuclei were stained with 10 μ M of Hoechst 33342 solution (Sigma), during 15 minutes and rinsed with PBS. Coverslips were then stucked to microscope slide using Vectashield HardSet Mounting Medium (Vector, Cliniscience, Montrouge, France).

Analyses were performed using a confocal microscope TCS-SP2 from Leica Microsystems (Leica®, Heidelberg, Germany). Images were obtained from the fluorescence emitted by FITC (ex: 488 nm; em: 495-550 nm), AlexaFluor®594 phalloidin (ex: 581 nm; em: 609 nm) and Hoechst (ex: 355 nm; em: 465 nm).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Cells were grown in 6 well plates (1 million cells in 4 mL) containing coverslips and NP were incubated for 24 hours. After washing to remove unfixed or non-internalized NP, cells on coverslips were fixed with a solution of 2% glutaraldehyde/0.2 N Cacodylate at pH 7.4, washed three times in 0.1 M sodium cacodylate buffer and postfixed in 1% osmium tetroxide. After washing, samples were dehydrated by graded series of ethanol baths, embedded in Epon and finally cut by ultramicrotomy. Observations were carried out using a Hitachi H-800 electron microscope operating at 200 kV.

Uptake quantification

Fluorescent quantification of respectively internalized NP and NP adhering to the cell membrane

Cells were grown in 96 well plates (100 000 cells per well in 200 μ L of complete culture medium). Medium was replaced by 200 μ L of diluted NP (ratio of 1000 NP/cell) in the test wells. Fluorescence intensity standard curves were simultaneously established for each size of NP and fluorescence was detected using a fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems), with excitation/emission wavelengths at 485/538 nm.

Measures of fluorescence were performed immediately after the addition of NP to cells and after 24 hours of incubation (37°C, 5% CO₂) with washing steps and use of trypan blue (TB) (diluted 1:2) for half of the media test wells. Using the standard curves established for each size of NP and as TB is known to quench the fluorescence of NP that are not internalized, this technique allows to determine precisely the number of NP in contact with cells (internalized and adhering to cell membrane and the precise number of internalized NP). Results are expressed as percentage of NP remaining in the supernatant, adherent NP to the cell membrane and intracellular NP.

Dosage of cellular silicon content by Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES)

Cells were grown in 25 cm² culture flasks (2 millions cells per flask in 4 mL of complete culture medium). NP (1000 NP/cell) were then added. Some of the flasks were immediately scrapped, the solution centrifuged and the pellet stocked at 4°C. Other flasks were incubated with NP for 24 hours before scrapping and centrifugation. The silicon concentration of cells was measured using ICP-OES (710-ES, Varian, Les Ulis, France). For this, 200 µL of 68% (vol/vol) nitric acid was added for 2 hours. The exact silicon concentration (ng/mL) was then measured at 251,611 nm.

Toxicity assessment

For each experiment, cells were prepared in 96-well plates (100 000 cells/well for TNF-α and LDH assays, and 300 000 cells/well for ROS and H₂O₂ parameters) in 25 µL of complete DMEM as described by Leclerc et al. (Leclerc et al.). NP (1000/cell in a volume of 75 µL of DMEM) were added to the culture and incubated for 24h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. In each case, control cells were incubated in the same conditions but without NP.

TNF-α production (Quantikine® Mouse TNF-α Immunoassay, R&D Systems), LDH release (CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega), oxidative stress (OxiSelect™ ROS Assay Kit, Euromedex) and specific Hydrogen Peroxide (H₂O₂) in acute (90

min) and chronic (24h) conditions (De la Harpe and Nathan, 1985) were analyzed as extensively described in previous work (Leclerc et al., 2010).

Statistical analysis

Analysis and graphics were performed on Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA).

Significance (***) was established with ANOVA test ($p < 0.05$).

RESULTS

Physicochemical characterizations

The physicochemical properties of synthesized NP are summarized in Table 1. All NP have the same weight ratio of FITC and the same chemical surface groups (*i.e.* carboxylic - COOH). This table also shows the silicon content of each NP and the amount of COOH groups per NP. Physicochemical characterizations in terms of size and zeta potential are compared in Table 2 for NP resuspended either in water or in complete culture media. There is a good correlation between the expected sizes of NP and the sizes measured using DLS and TEM, except for the 150 nm NP which appears smaller in TEM. There are no noticeable differences between sizes evaluated by DLS in water or in complete culture media. Finally zeta potential values all appear negative but are clearly higher (2 fold) in culture media than in water. This phenomenon may be due to the adsorption of proteins contained in the culture medium on the NP even if further investigations are needed to confirm this hypothesis.

NP size and shape were visually controlled using SEM and TEM (Figure 1). NP appeared spherical, non-agglomerated and the size ranges were well defined. Moreover concerning the agglomeration state, NP size distribution was assessed in complete culture media over time (0, 8 and 24h) as shown on Figure 2. Results indicate that of the different synthesized NP present a strong stability avoiding agglomeration phenomena even in culture media containing serum.

The spectral analysis of the FITC was also checked for each size of NP (Figure 3). A specific fluorescence intensity (arbitrary unit) was observed for each type of nanoparticles due to the weight ratio of FITC employed in the NP synthesis. These variations are normal but important to consider in the rest of the study especially for the fluorescence quantification with the fluorometer. Thus standard curves for each synthesized NP size have to be established.

Microscopy uptake assay

After cellular contacts, NP were checked using confocal microscopy. As shown on Figure 4, NP were detectable and confocal observations allow to distinguish NP localization using stacks sections. In each case NP were surrounded by the actin cytoskeleton labeling validating their internalization by macrophages.

TEM acquisitions were then performed to detect more precisely NP localization in the intracellular compartment (Figure 5). Electron micrographs obtained using an electron beam at 200 kV, show that, after incubation at a concentration of 1000 NP/cell, particles are gathered in cells vesicles precisely separated from the cytoplasm by a double membrane. Moreover TEM images indicate that NP could be internalized in a single manner or by groups (two, three or more). Micrographs also give some indication about the mechanism of internalization. Adhesion steps have been visualized in SEM and shown particles absorbed onto the cell membrane (data not shown).

Fluorescent and chemical uptake quantification

Results of the fluorimetric quantification of NP uptake are presented on Figure 6 where the amount of NP (expressed as a percentage) is reported depending on their localization: either at the membrane surface, in the intracellular space or remained in the culture supernatant. The measurement of the total fluorescence of FITC allows to determine the number of NP internalized and adhering to the cell membranes. Then the precise quantification of the amount of NP entirely engulfed in the cells was made possible by the use of TB which is known to quench the fluorescence of the NP remained outside the cells. Finally, the amount of NP remained in the supernatant was determined by deduction (total number of NP – amount of NP adhering to membranes and internalized – amount of NP entirely internalized within cells).

The 850, 500 and 250 nm NP are internalized at the same rate, respectively 17%, 14% and 12% with very low percentage of adhered NP (2% or 4%). On the contrary, the smallest NP appeared

much more internalized (24%) with a non negligible 10% of adherence. This methodology also allows to express the results in number of NP internalized per cell (*e.g.*: 148 ± 5 for the 500 nm NP and 265 ± 32 for the 150 nm NP).

A chemical quantification of the NP silica content was also performed using ICP-OES. Results are also expressed in percentage of NP per cell in order to be compared to the fluorescence quantification. As demonstrated on Figure 7, results seem under-estimated around 50% of NP internalized or adhered with aberrant 90% for the 250 nm NP. These results are contradictory with the images obtained in TEM or confocal.

These technique is maybe less sensitive than fluorometer evaluations as we observed more important error bars. Moreover ICP-OES does not permit distinction between adhered and internalized NP like fluorometer analyses.

Toxicity assessment

Concerning toxicity assessment, results are presented on Figure 8. The dose employed was fixed at 1000 NP per cell. Results shown a size dependent effect from the smallest to the biggest NP sizes especially for the parameters of TNF- α reflecting inflammation and LDH significant of membranes alterations (Figure 8 A and B). The ROS production was also assessed for specific hydrogen peroxide (Figure 8 C and D) and total ROS production (Figure 8 E). Effects were not significant regarding total and chronic ROS but a slight increase (nmol) was noticed for acute ROS for the biggest NP.

The 850 nm NP appears biologically more active than the other at the dose employed in this study.

DISCUSSION

This study aimed at understanding the correlation between NP physicochemical characteristics (especially the size), their cellular uptake and the associated toxicity. Fluorescent NP of various submicronic sizes (850, 500, 250 and 150 nm) but exhibiting the same surface coating (COOH) were characterized for sizes and zeta potential by DLS, TEM and their fluorescent spectra were also measured. Hydrodynamic size distributions evaluated by DLS were in agreement with geometric sizes measured from TEM observations. Moreover concerning possible agglomeration state of NP, no noticeable differences were observed between DLS measurement performed in water and in complete culture media. A strong stability over time of synthesized NP were exhibited due to the COOH surface functionalization leading to negatives values of zeta potential.

First, the physicochemical features of the fluorescent NP were well defined and well dispersed which is a mandatory step for further toxicological evaluations (Ahsan et al., 2002, Fubini et al., 2010, Warheit, 2010). Once well characterized, the nanoparticles were incubated with a macrophage cell line, the NP cellular uptake was visualized, quantified and then the biological parameters were evaluated.

Even if microscopy visualization confirms the efficiency of NP uptake with a precise localization of NP throughout cells, quantification could not be done precisely and statistically on images (Song et al., 2010, Clift et al., 2008). Another technique allowing to quantify the physical process of internalization remains necessary. Moreover the proportion of adhered NP is also an important factor to take into account (Gratton et al., 2008). This is the reason why we have developed two quantitative complementary approaches for NP cellular uptake: 1) fluorescent detection using fluorometer with TB quenching to distinguish entirely engulfed fluorescent particles from those that just adhered to the cell membrane adapted from (Leclerc et al., 2010) and 2) silicon dosage by ICP-OES (Cho et al., 2009).

Results indicate that fluorometer analyses seem more sensitive than ICP-OES for the quantification of NP cellular uptake. Trypan blue allowed distinction between the number of

internalized and adherent NP and could be expressed as percentage of NP in different compartments (intracellular, adhered or supernatant). Fluorescent quantification indicates that NP of 150 nm (smallest NP) appeared more internalized than the others (24%). Another important aspect visualized on TEM images is that many NP could be internalized in a same vesicle or sometimes are free in cell cytoplasm. For the NP sizes used in this study, phagocytosis is generally the specific pathway employed by phagocytic cells such as macrophages but other internalization pathways could be involved (Gratton et al., 2008, Aderem and Underhill, 1999, Castellano et al., 2001, Etienne-Manneville and Hall, 2002, Haberzettl et al., 2007, Lanzetti, 2007, Niedergang and Chavrier, 2004, Niedergang and Chavrier, 2005, Yeung and Grinstein, 2007). It would be interesting in another study to explore pathways such as energy-dependent phagocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, or macropinocytosis.

Finally, these quantitative data were correlated to *in vitro* toxicity assessments (TNF- α and LDH release, ROS production). Toxicity evaluations showed that the doses employed were very important in the results interpretation (Fubini et al., 2010, Oberdorster et al., 2005). We decided in this study to work with equivalent number of NP independently of the sizes, a metric currently used in uptake studies (Champion et al., 2008). At this dose, the biggest NP (850 nm) appeared more biologically reactive (higher values *e.g.* for TNF- α as compared to control cells) with a significant size effect. It will be interesting to reproduce analysis with the same volume or the same surface of NP for the different sizes at different doses.

This work shows no direct relationship between the amount of internalized NP and the biological data of the induced toxicity. Indeed, 150 nm NP are more internalized but their biological effects are not significant for the different parameters evaluated. When working at the 1000 NP/1 cell specific ratio, the biggest NP (850 nm) are more toxicologically reactive.

Conclusion

We established in this study a methodology to better understanding of NP uptake analysis coupling imaging, quantification techniques and biological evaluations. This approach confirms that NP size represents a key physicochemical characteristic which has an important impact on uptake but with no direct correlation to biological activity. We exposed an appropriate and precise methodology to investigate the relationship between NP size, level of uptake and induced toxicity working with well-characterized NP. It will be interesting to investigate other parameters such as surface charge of NP (Lundqvist et al., 2008).

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no declarations of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge the help and support of our collaborators. We are grateful to Nano-H Company for providing the nanoparticles. We also acknowledge the excellent assistance of CT μ (Centre Technique des Microstructures) for cells samples preparation for TEM, and CMES (Centre de Microscopie Electronique Stéphanois) for TEM observation. We are also grateful to Centre de Quantimétrie Cellulaire for the confocal images.

FIGURE CAPTIONS

Expected size (nm)	[Si] M	% FITC	Surface groups	COOH/NP
150	2,7	3%	COOH	1,89E+07
250	2,5	3%	COOH	6,75E+07
500	1,65	3%	COOH	2,62E+08
850	2,2	3%	COOH	4,90E+08

Table 1: Characteristics of the four types of NP.

Expected size (nm)	Mean size in TEM (nm)	Water		DMEMc	
		Mean size by DLS (nm)	Zeta potential (mV)	Mean size by DLS (nm)	Zeta potential (mV)
150	67 ± 6	139 ± 2	-54,2 ± 0,9	158 ± 3	-23,1 ± 1,4
250	275 ± 26	252 ± 4	-54,5 ± 0,9	279 ± 4	-24,5 ± 1,5
500	446 ± 37	492 ± 6	-65,6 ± 0,3	536 ± 10	-22,6 ± 2,2
850	760 ± 25	847 ± 19	-68,7 ± 0,1	820 ± 10	-17,1 ± 1,6

Table 2: Measurement of NP sizes and zeta potential. NP mean sizes were evaluated on TEM images. Comparison were established between size distributions evaluated by DLS and zeta potential for NP diluted in water or in complete cellular culture medium (DMEMc).

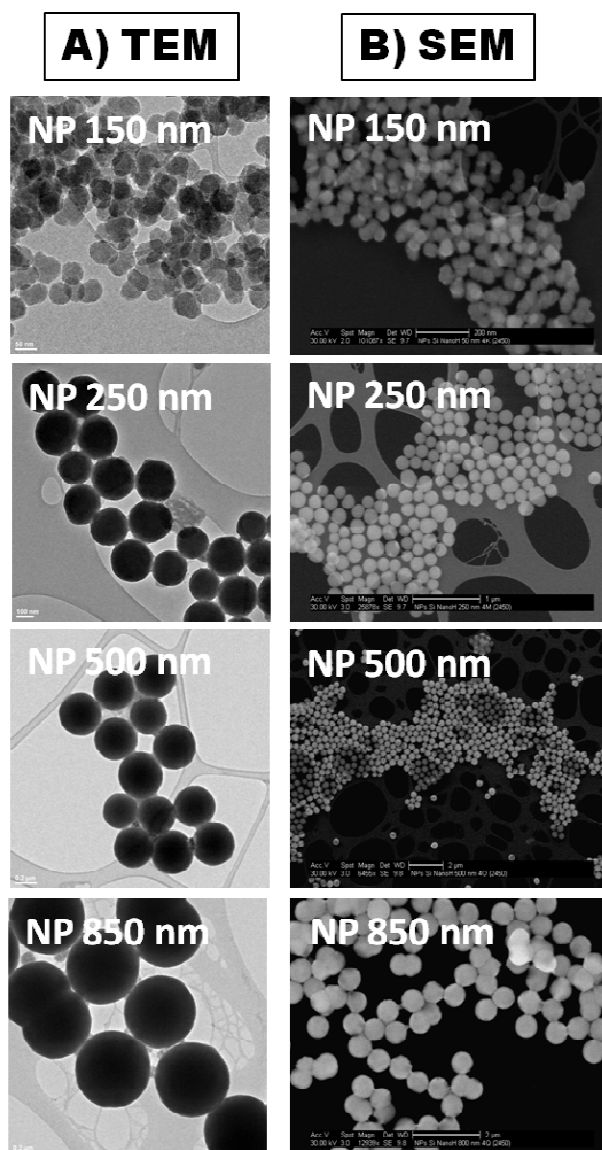


Figure 1: TEM (column A) and SEM (column B) imaging of the four types of NP in cell free conditions.

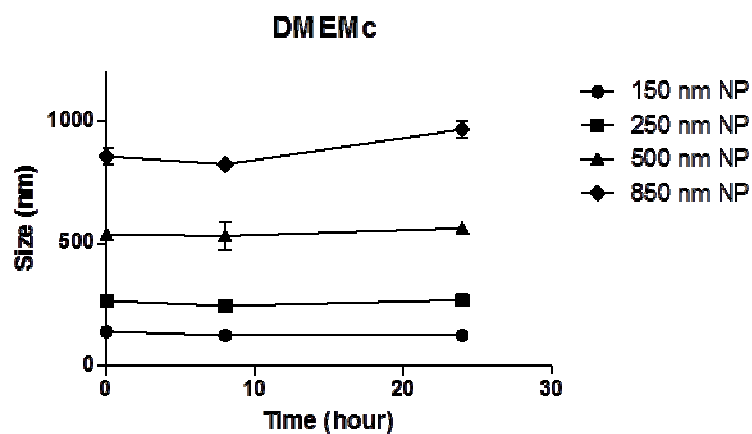


Figure 2: DLS evaluations of NP size distribution in complete culture media (DMEMc) for different times of incubation (0, 8 and 24h) in cell free conditions.

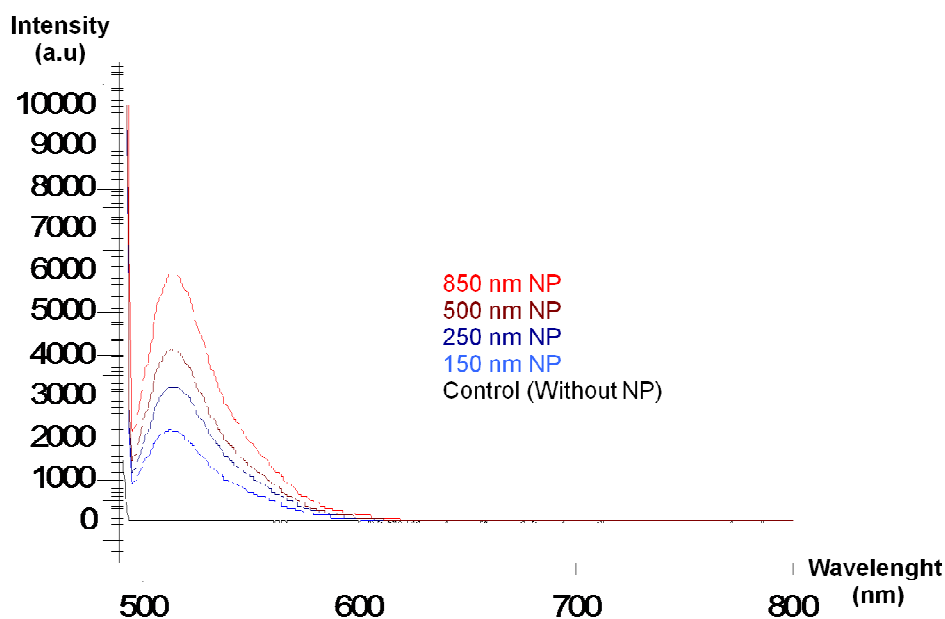


Figure 3: Fluorescence intensity evaluated in arbitrary units for each NP type. Spectral measurements were acquired with an excitation wavelength of 490 nm and emission fluorescence spectral curves were collected over the 490-800 nm wavelength range. The four sizes of NP show a specific peak of FITC between 490 and 560 nm.

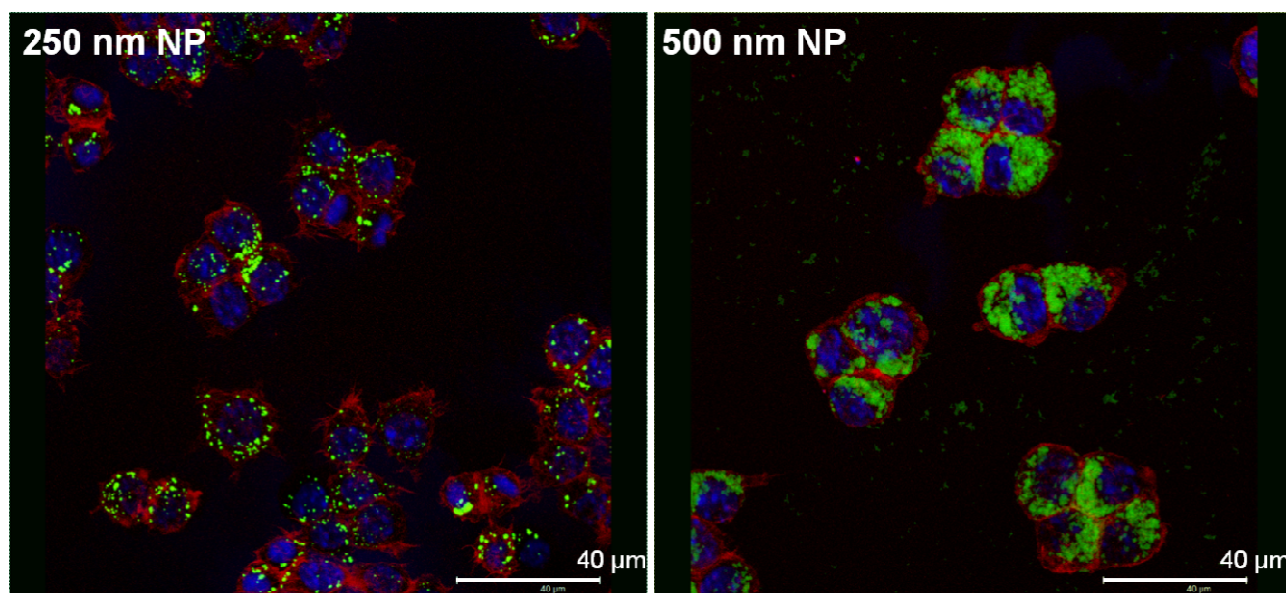


Figure 4: Confocal microscopy images of macrophages incubated with FITC-NP (1000/1 cell) for 24 hours. Phalloidin (F-actin) and Hoechst (cell nuclei) labelings allowed structures localizations.

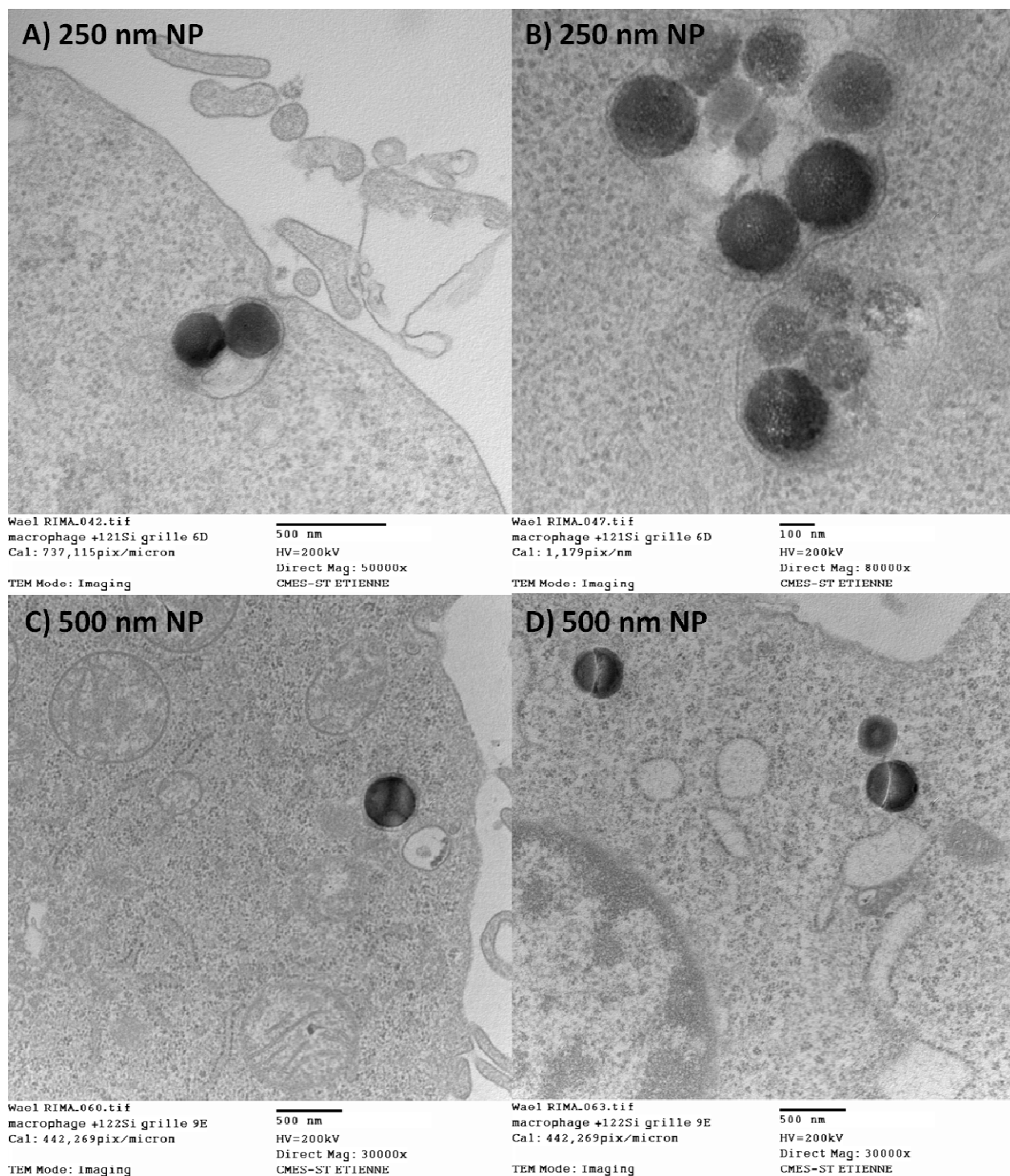


Figure 5: Electron microscopy of NP after cellular contacts with RAW 264.7 macrophages for 24 hours. Images A) and B) show 250 nm NP and images C) and D) show 500 nm NP. These images show NP internalized within the cells in the cytoplasm gathered in double membrane vacuoles. 500 nm NP seem internalized individually whereas several 250 nm NP are internalized in a same vesicle.

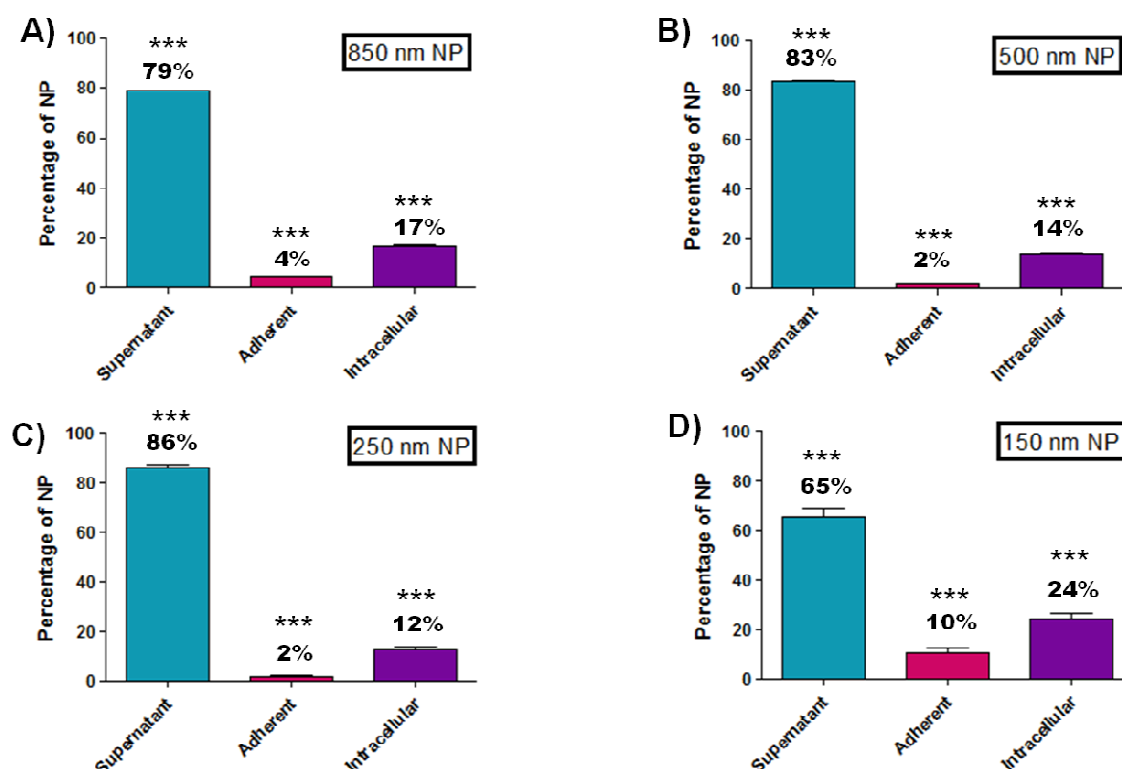


Figure 6: Uptake quantification using trypan blue quenching with Fluoroskan analysis. Results are expressed as percentage of NP per compartment: supernatant, adherent on cell membranes, intracellular. Standard curves in number of NP have been established for each size of NP. This figure presents one graphic per size: A) 850 nm NP, B) 500 nm NP, C) 250 nm NP and D) 150 nm NP. For each size, experimentations were performed independently four times (n=4).

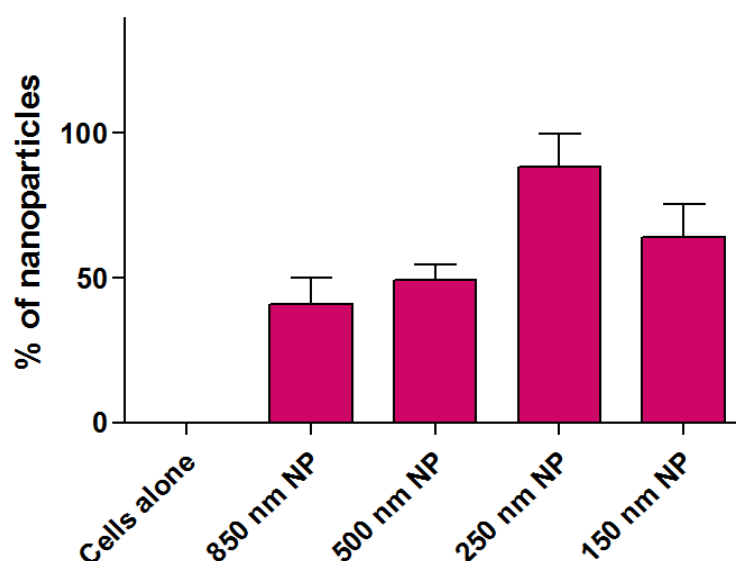


Figure 7: Uptake quantification determined using ICP-OES. Results are expressed as percentage of nanoparticles in the sample normalized with the total amount of NP for the four types of NP after 24 hours of contact with the macrophages.

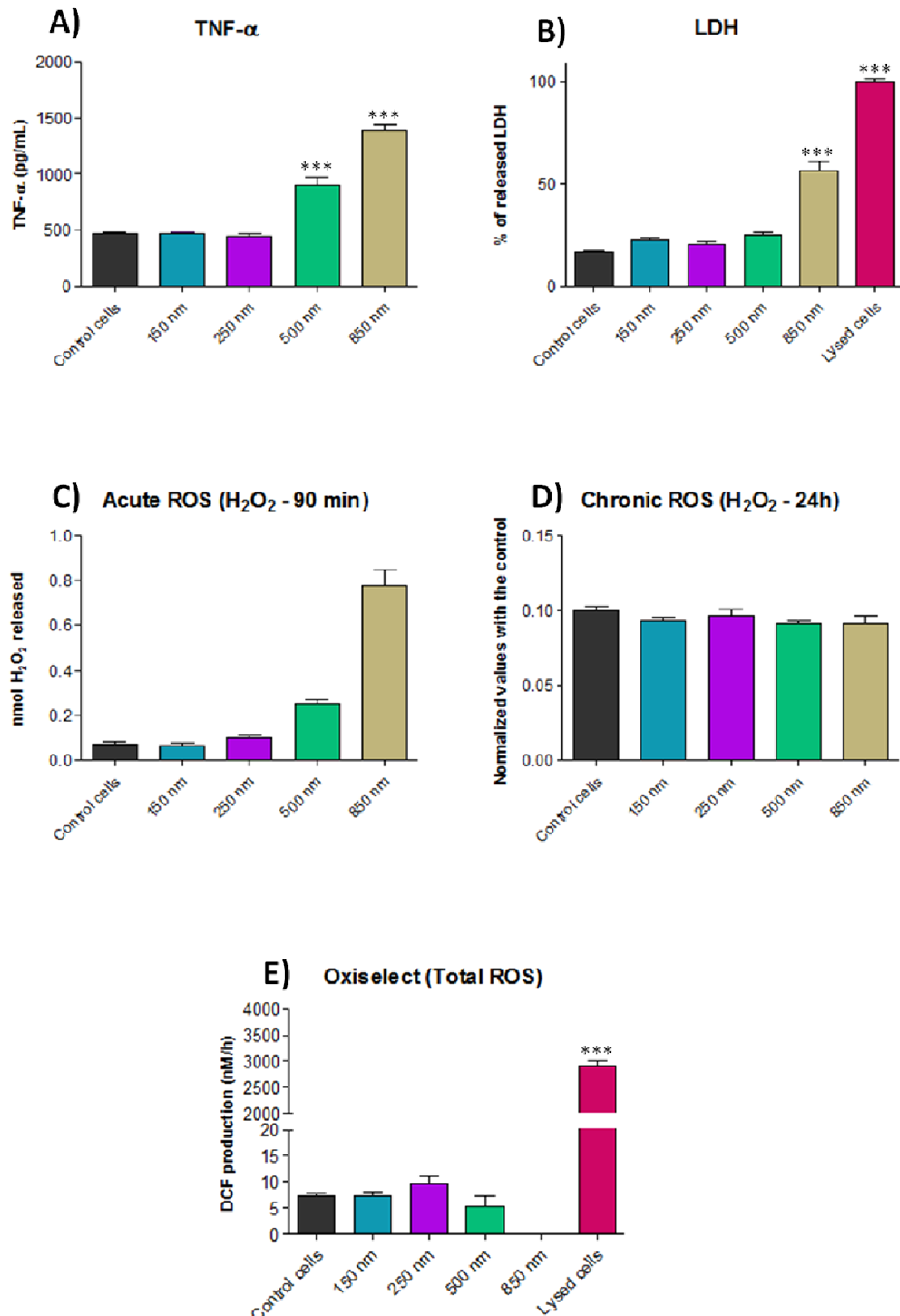


Figure 8: Toxicological analysis of the different sizes of NP (150, 250, 500 and 850 nm) incubated with RAW 264.7 cells for 24 hours. 1000 NP per cell were added to the cultures in these experiments. A) TNF- α production, B) percentage of released LDH, C) and D) H₂O₂ produced in acute or chronic conditions E) total ROS generated (n=4, *p<0.05).

REFERENCES

- ADEREM, A. & UNDERHILL, D. M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593-623.
- AHSAN, F., RIVAS, I. P., KHAN, M. A. & TORRES SUAREZ, A. I. 2002. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages. *J Control Release*, 79, 29-40.
- BRUCH, J., REHN, S., REHN, B., BORM, P. J. & FUBINI, B. 2004. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 203-16.
- CASTELLANO, F., CHAVRIER, P. & CARON, E. 2001. Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol*, 13, 347-55.
- CATELAS, I., PETIT, A., MARCHAND, R., ZUKOR, D. J., YAHIA, L. & HUK, O. L. 1999. Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles in vitro. *J Bone Joint Surg Br*, 81, 516-21.
- CHAMPION, J. A., WALKER, A. & MITRAGOTRI, S. 2008. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. *Pharm Res*.
- CHO, E. C., XIE, J., WURM, P. A. & XIA, Y. 2009. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Lett*, 9, 1080-4.
- CLIFT, M. J., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., BROWN, D. M., DUFFIN, R., DONALDSON, K., PROUDFOOT, L., GUY, K. & STONE, V. 2008. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 232, 418-27.
- DE LA HARPE, J. & NATHAN, C. F. 1985. A semi-automated micro-assay for H₂O₂ release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Immunol Methods*, 78, 323-36.
- DONALDSON, K., BROWN, D., CLOUTER, A., DUFFIN, R., MACNEE, W., RENWICK, L., TRAN, L. & STONE, V. 2002. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med*, 15, 213-20.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S. & HALL, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420, 629-35.
- FENTEANY, G. & GLOGAUER, M. 2004. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol*, 11, 15-24.
- FUBINI, B. 1998. Surface chemistry and quartz hazard. *Ann Occup Hyg*, 42, 521-30.
- FUBINI, B., FENOGLIO, I., CESCHINO, R., GHIAZZA, M., MARTRA, G., TOMATIS, M., BORM, P., SCHINS, R. & BRUCH, J. 2004. Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 89-104.
- FUBINI, B., GHIAZZA, M. & FENOGLIO, I. 2010. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*, 4, 347-63.
- GRATTON, S. E., ROPP, P. A., POHLHAUS, P. D., LUFT, J. C., MADDEN, V. J., NAPIER, M. E. & DESIMONE, J. M. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11613-8.

- HABERZETTL, P., DUFFIN, R., KRAMER, U., HOHR, D., SCHINS, R. P., BORM, P. J. & ALBRECHT, C. 2007. Actin plays a crucial role in the phagocytosis and biological response to respirable quartz particles in macrophages. *Arch Toxicol*, 81, 459-70.
- HED, J., HALLDEN, G., JOHANSSON, S. G. & LARSSON, P. 1987. The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods*, 101, 119-25.
- HU, Y., XIE, J., TONG, Y. W. & WANG, C. H. 2007. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. *J Control Release*, 118, 7-17.
- LANZETTI, L. 2007. Actin in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 453-8.
- LECLERC, L., BOUDARD, D., POURCHEZ, J., FOREST, V., SABIDO, O., BIN, V., PALLE, S., GROSSEAU, P., BERNACHE, D. & COTTIER, M. 2010. Quantification of micro-sized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhal Toxicol*, 22, 1091-100.
- LUNDQVIST, M., STIGLER, J., ELIA, G., LYNCH, I., CEDERVALL, T. & DAWSON, K. A. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14265-70.
- NIEDERGANG, F. & CHAVRIER, P. 2004. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 422-8.
- NIEDERGANG, F. & CHAVRIER, P. 2005. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 291, 43-60.
- NUUTILA, J. & LILIUS, E. M. 2005. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A*, 65, 93-102.
- OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E. & OBERDORSTER, J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113, 823-39.
- RAVETCH, J. & ADEREM, A. 2007. Phagocytic cells. *Immunol Rev*, 219, 5-7.
- REJMAN, J., OBERLE, V., ZUHORN, I. S. & HOEKSTRA, D. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, 377, 159-69.
- SAYES, C. M., REED, K. L. & WARHEIT, D. B. 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci*, 97, 163-80.
- SERDA, R. E., GU, J., BURKS, J. K., FERRARI, K., FERRARI, C. & FERRARI, M. 2009. Quantitative mechanics of endothelial phagocytosis of silicon microparticles. *Cytometry A*, 75, 752-60.
- SONG, M. M., SONG, W. J., BI, H., WANG, J., WU, W. L., SUN, J. & YU, M. 2010. Cytotoxicity and cellular uptake of iron nanowires. *Biomaterials*, 31, 1509-17.
- SU, Y., XU, J. Y., SHEN, P., LI, J., WANG, L., LI, Q., LI, W., XU, G. T., FAN, C. & HUANG, Q. 2010. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullerene in different cell lines. *Toxicology*, 269, 155-9.
- THIELE, L., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., JILEK, S., WUNDERLI-ALLENSPACH, H., MERKLE, H. P. & WALTER, E. 2001. Evaluation of particle uptake in human blood

- monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release*, 76, 59-71.
- VAN AMERSFOORT, E. S. & VAN STRIJP, J. A. 1994. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry*, 17, 294-301.
- VAN BLAADEREN, A. & VRIJ, A. 1992. Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres. *Langmuir*.
- WANG, W., GU, B., LIANG, L. & HAMILTON, W. 2003. Fabrication of Two- and Three-Dimensional Silica Nanocolloidal Particle Arrays. *The Journal of Physical Chemistry B*.
- WARHEIT, D. B. 2010. Debunking Some Misconceptions about Nanotoxicology. *Nano Lett*, 4777-4782.
- WARHEIT, D. B., LAURENCE, B. R., REED, K. L., ROACH, D. H., REYNOLDS, G. A. & WEBB, T. R. 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci*, 77, 117-25.
- YAN, F., ZHANG, C., ZHENG, Y., MEI, L., TANG, L., SONG, C., SUN, H. & HUANG, L. 2010. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine*, 6, 170-8.
- YEUNG, T. & GRINSTEIN, S. 2007. Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol Rev*, 219, 17-36.

III.1.2 Données complémentaires

III.1.2.1 Aspects morphologiques

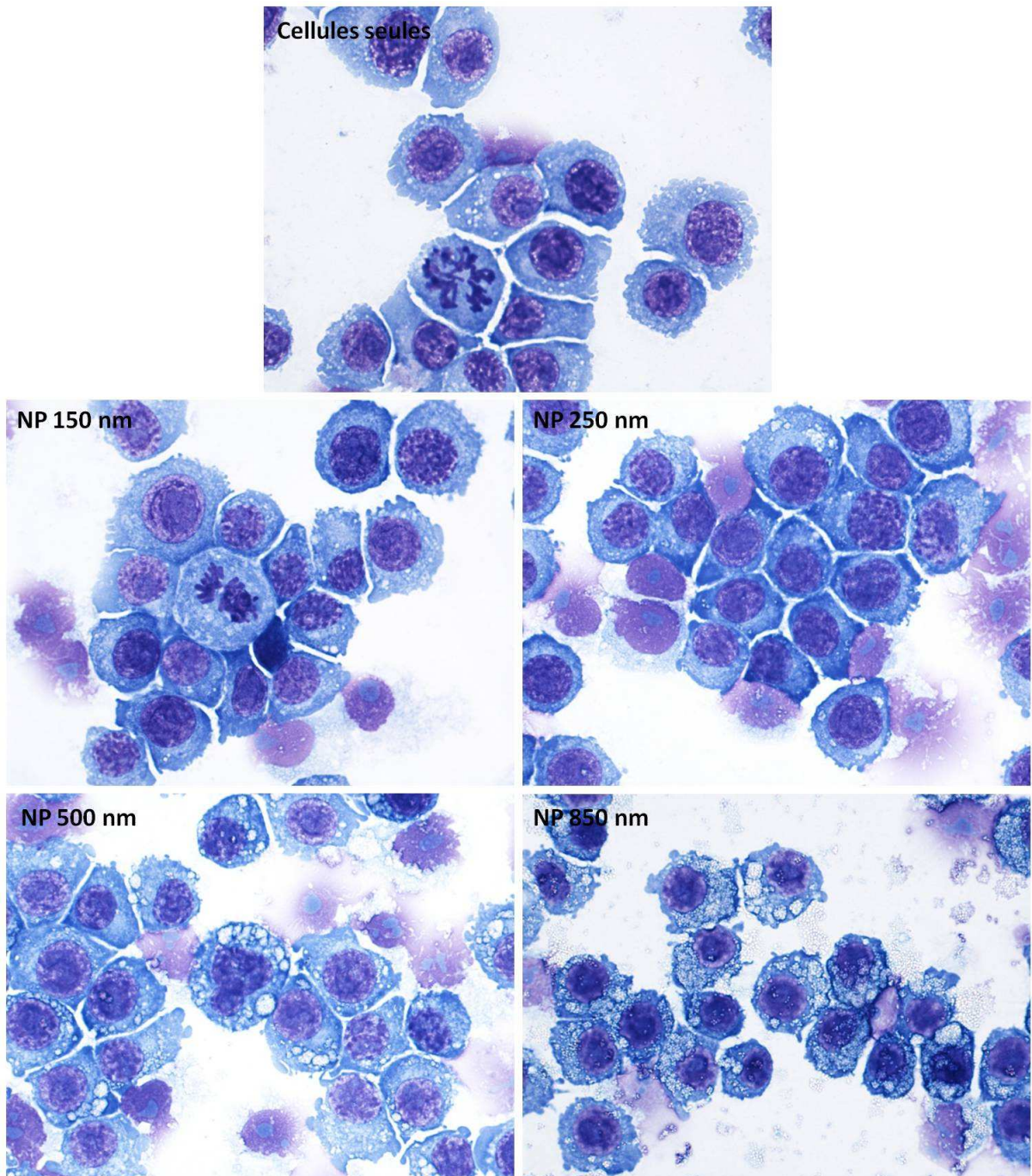


Figure 61 : Images représentatives des données morphologiques observables pour les quatre tailles de nanoparticules incubées 24h avec les macrophages puis cytocentrifugées sur lame et colorées au MGG (objectif x60).

Pour les tailles de 150 et 250 nm, les aspects morphologiques sont comparables aux cellules seules (**Figure 61**). En revanche pour les deux plus grosses tailles (500 et 850 nm), les macrophages ont un cytoplasme très fortement vacuolisés avec a priori de nombreuses nanoparticules au sein d'une même vésicule et les membranes cellulaires présentent un aspect bourgeonnant.

III.1.2.2 Distribution en taille des nanoparticules

La **Figure 62** présente la superposition des profils de distribution en taille obtenus après DLS. Les résultats ont montré une bonne corrélation entre les tailles attendues et les tailles mesurées.

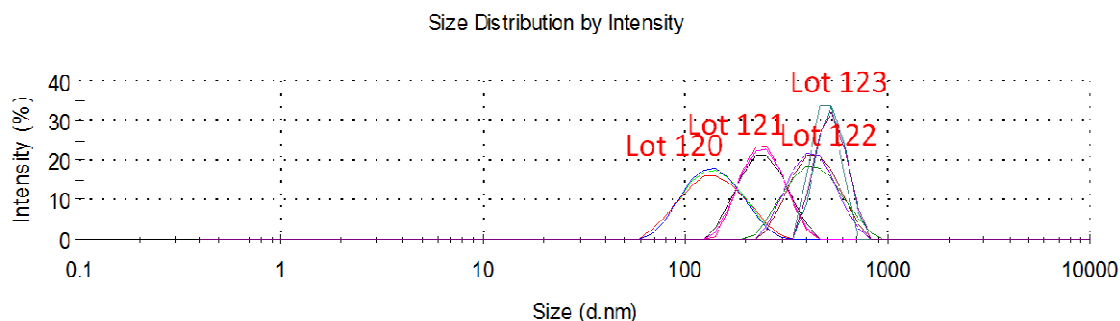


Figure 62 : Profil obtenu après analyse en DLS des 4 tailles de nanoparticules ($n=3$).

III.1.3 Bilan sur l'impact du paramètre taille des nanoparticules

Nos nanoparticules modèles fluorescentes FITC avec une fonctionnalisation carboxylate de surface ont pu être efficacement déclinées en quatre tailles. L'analyse des paramètres physico-chimiques nous a permis de valider la bonne caractérisation de nos particules.

La quantification développée en fluorimétrie pour ces nanoparticules FITC s'est avérée efficace et précise grâce à la combinaison avec le quenching au bleu trypan développé dans la première partie de cette thèse. La quantification selon le dosage par ICP de la silice pourrait être optimisée.

Enfin de multiples techniques d'observations microscopiques sont venues compléter les analyses quantitatives. La microscopie photonique est un bon indicateur de l'aspect morphologique général des cellules. La MEB nous renseigne sur les modifications de la surface des cellules tandis que la MET permet une localisation intracellulaire beaucoup plus fine et précise. Ainsi les nanoparticules ont clairement été observées dans des vésicules d'internalisation, soit de façon isolée (une nanoparticule par vésicule) soit en nombre beaucoup plus important (plusieurs nanoparticules par vésicule). Enfin la microscopie confocale est un outil essentiel de semi-quantification lors du travail avec des molécules fluorescentes. Ces images nous ont renseignés sur l'importante quantité de nanoparticules internalisées mais des progrès restent à faire concernant la quantification à partir de ces images.

Il est clairement apparu que les nanoparticules de 150 nm sont plus internalisées que les particules de taille supérieure. En revanche nous n'avons pas observé de corrélation directe avec les données d'activité biologiques. Le paramètre taille apparaît cependant comme un élément clé dans les phénomènes d'internalisation.

III.2 Perspectives sur l'impact du paramètre charge de surface des nanoparticules

Dans le cadre de la collaboration établie entre notre laboratoire et le laboratoire MATEIS (Matériaux : Ingénierie et Science) de l'INSA de Lyon (Institut National des Sciences Appliquées), la suite des travaux est poursuivie sur l'impact du paramètre « charge » des nanoparticules sur leur internalisation et leurs données biologiques de toxicité dans des macrophages murins et des lymphocytes T humains. L'objectif de travailler en parallèle sur deux types de lignées cellulaires aux propriétés différentes devrait permettre de mieux comprendre les interactions qui peuvent s'établir avec un modèle cellulaire normalement dénué d'activité phagocytaire (lymphocytes). Dans l'expectative de phénomènes d'internalisation, nous serions ainsi mieux à même d'évaluer d'autres voies d'entrée dans la cellule.

Pour cela, nous avons développé une nouvelle gamme de nanoparticules Si-Au de fluorescence FITC ou RBITC (Rhodamine B isothiocyanate) avec des groupements de surface variables et donc une charge de surface différente (positive ou négative) mais une taille standard stable de 50-60 nm. Les nanoparticules sont synthétisées au Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents (LPCML).

La synthèse de ces nanoparticules de silice d'une cinquantaine de nm est basée sur le même principe que les nanoparticules FITC de chez Nano-H. Elles sont obtenues par une méthode de microémulsions adaptée pour la synthèse *in situ* d'un cluster d'or (Si-Au) et de son encapsulation dans la couche de polysiloxane fluorescent. L'objectif de ce cœur d'or est d'obtenir une quantification en ICP plus précise (quantification qui s'est avérée peu sensible pour la silice) mais aussi permettre d'obtenir un meilleur contraste pour les observations en MET.

La méthodologie du travail attendu est similaire à celle développée pour les nanoparticules de tailles différentes soit :

- Caractérisation physicochimique des nanoparticules (DLS, MET, potentiel zêta) en conditions acellulaires.
- Analyses de toxicité (LDH et MTT).
- Observation (MET et confocal) et quantification (ICP) de l'internalisation cellulaire des nanoparticules.

Ces travaux étant en cours, voici les résultats préliminaires obtenus en microscopie confocale.

Les observations des macrophages ont été réalisées à l'aide des techniques développées précédemment (**Figure 63**).

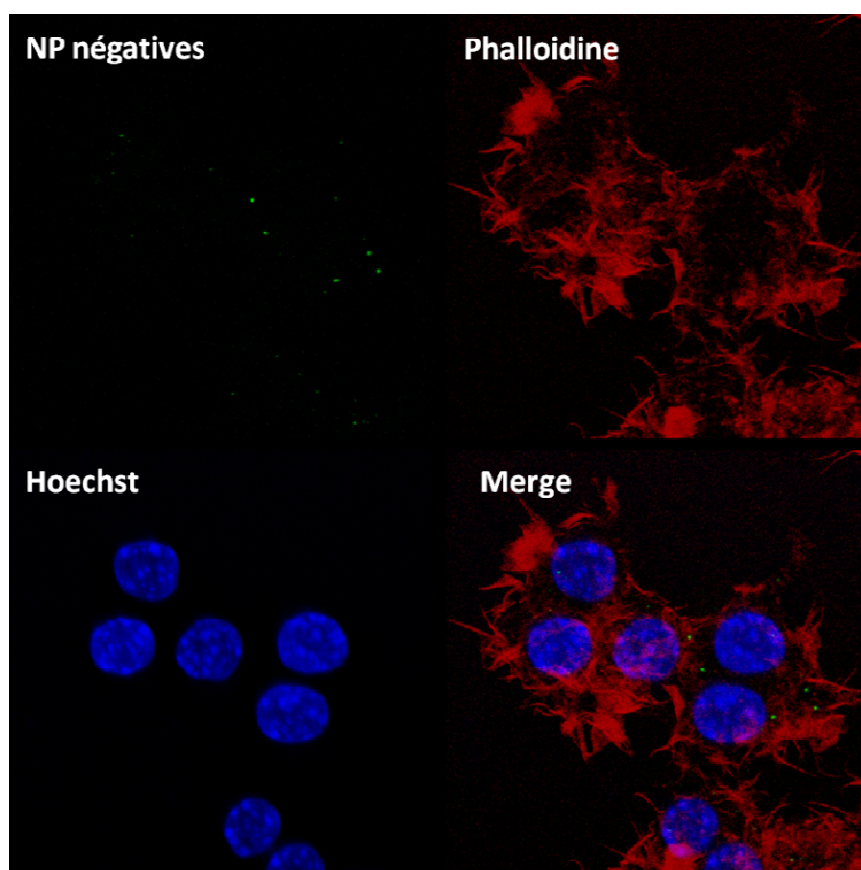


Figure 63 : Observation en microscopie confocale de macrophages RAW 264.7 après contact de 24h avec des nanoparticules FITC de charge négative.

L'analyse des lymphocytes, qui constituent une population de cellules en suspension, a nécessité la mise au point de nouveaux marqueurs fluorescents. Dans ce cas, les nanoparticules avaient une fluorescence rouge due à l'utilisation de RBITC au lieu de la FITC. Deux lots de nanoparticules ont été testés, Si12 et Si13.

Les cellules LH T2 sont cultivées à 37°C/5% de CO₂ dans des flasques T75 avec du milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) complémenté avec du Sérum de Veau Foetal (SVF 10%) et des antibiotiques (Pénicilline – Streptomycine 5%).

Les nanoparticules Si-Au ayant une fluorescence rouge, les lymphocytes ont été marqués avec un anticorps membranaire CD45 humain (anticorps primaire) couplé à une sonde fluorescente verte (Alexa Fluor 488) par marquage indirect (anticorps secondaire). Le marqueur membranaire CD45 est naturellement présent à la surface des lymphocytes T2 (CRL-1992). Les cellules ont ensuite été fixées puis les noyaux marqués au Hoechst (**Figure 64**).

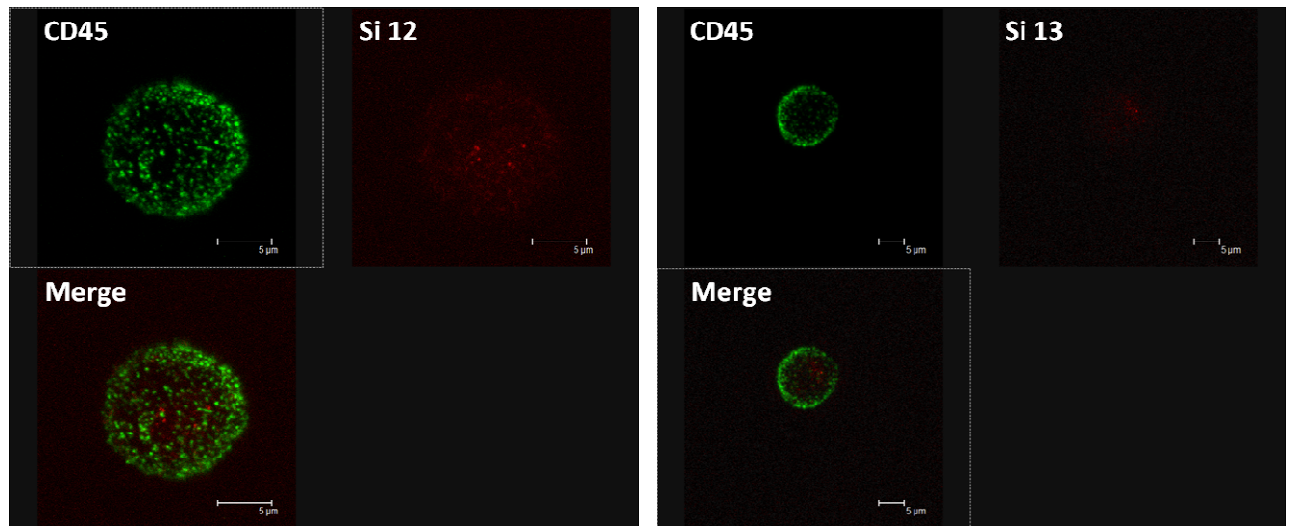


Figure 64 : Observation en microscopie confocale de lymphocytes LH T2 après contact de 24h avec des nanoparticules RBITC Si 12 ou Si 13 (rouge). Le marqueur membranaire de surface CD45 est vert.

Ces résultats préliminaires se sont avérés encourageants. Les nanoparticules ont été visualisables en microscopie confocale et le marquage fluorescent CD45 s'est avéré efficace pour identifier convenablement des lymphocytes.

CONCLUSIONS PERSPECTIVES

L'objectif principal de ces travaux de thèse a porté sur une meilleure quantification des mécanismes d'internalisation cellulaire des nanoparticules, en particulier du processus de phagocytose, avec l'implication des paramètres physico-chimiques et l'évaluation de l'activité biologique. Notre étude souligne, à travers les données de la littérature, l'importance d'une quantification précise de l'internalisation avec une distinction des particules adhérentes à la membrane plasmique et internalisées dans les cellules. En ce sens ces travaux se sont attachés à développer des outils de quantification, et des méthodologies d'observations microscopiques, de caractérisations physico-chimiques et d'évaluation de l'activité biologique à l'aide d'un modèle *in vitro* de macrophages.

Les travaux présentés dans la première publication ont concerné la mise en place de la méthodologie expérimentale grâce à un modèle commercial de particules micrométriques fluorescentes permettant une quantification précise de l'internalisation grâce à la CMF et le développement de marqueurs fluorescents pour la microscopie confocale. Nous avons montré dans cette première partie que la quantification directe de la phagocytose en CMF grâce à un quenching par le bleu trypan était efficace et reproductible, l'observation est contrôlée en microscopie confocale et les analyses de toxicité sont fiables et reproductibles. Outre l'aspect quantitatif, nous avons aussi cherché à mieux comprendre l'impact des paramètres physico-chimiques des particules et plus particulièrement la taille et de la charge. Dans ces travaux, la taille (1 et 2 μm) et la fonctionnalisation (carboxylate ou amine) des particules variaient ce qui nous a permis de souligner l'importance de ces paramètres sur la quantification de l'internalisation et l'activité biologique sans toutefois nous permettre de conclure quant à l'importance respective de chacun d'entre eux.

Les chapitres suivants se sont attachés au développement de particules fluorescentes à façon de dimensions nanométriques. En effet une fois les mises au point effectuées sur des particules de taille micrométrique, nous nous sommes intéressés à la quantification de l'internalisation et l'évaluation de l'activité biologique de nanoparticules de physico-chimie contrôlée et modulable (taille et groupements de surface).

Dans la deuxième publication, nous avons synthétisé un modèle de particules nanométriques original et innovant permettant la quantification de l'internalisation cellulaire. Ainsi nous avons co-développé des nanoparticules de 250 et 500 nm doublement fluorescentes (FITC et pHrodo) et de faible activité biologique. La fluorescence FITC au cœur de la nanoparticule est confinée, tandis que la sonde pHrodo (sensible aux variations de pH intervenant au cours de l'internalisation au sein des phagolysosomes), est dans une enveloppe poreuse la rendant accessible par le milieu environnant la nanoparticule. Les deux tailles de nanoparticules ont été internalisées de façon équivalente et les données biologiques nous ont permis de conclure que l'ajout de pHrodo dans l'enveloppe poreuse de la nanoparticule ne modifie pas son activité biologique. Ces nanoparticules sont donc intéressantes pour mieux comprendre les phénomènes d'internalisation et nécessiteraient d'être synthétisées selon des gammes de taille et de charge de surface plus larges afin de mieux comprendre l'impact respectif de ces deux paramètres physico-chimiques tout en optimisant le rendement de fluorescence du pHrodo de façon à permettre cette fois-ci des analyses quantitatives par fluorimétrie plus poussées qu'une analyse de la fluorescence en microscopie confocale, telle qu'elle a été décrite dans la publication 2.

Parallèlement au développement de ces nanoparticules doublement fluorescentes, nos travaux se sont focalisés sur l'effet du paramètre physico-chimique « taille » sur le niveau d'internalisation et les données biologiques de toxicité. Ainsi une gamme de quatre tailles de nanoparticules (150, 250, 500 et 850 nm) a été synthétisée et caractérisée. Une nouvelle méthodologie de quantification et d'observation a enfin été développée et améliorée par rapport aux travaux mis en place pour les microparticules. Ainsi la quantification de l'internalisation a été reproduite avec un quenching au bleu trypan mais pour des applications fluorimétriques permettant une quantification plus précise. Les observations ont été poussées jusqu'au niveau intracellulaire avec la mise en place d'observations en MET. Ces travaux nous ont permis de souligner que les nanoparticules de plus petite taille (150 nm) sont plus internalisées pour la dose de 1000 NP/cellule employée. Il n'y a pas de relation directe entre l'internalisation cellulaire des nanoparticules et les données biologiques de toxicité. Comme les données de la littérature concernant l'expression métrique des doses à utiliser font polémique (**Oberdorster et al., 2005**, **Warheit, 2010**) il semble nécessaire pour les analyses futures de travailler avec trois systèmes métriques. Ainsi les doses devraient être exprimées en nombre, en surface et en masse de façon à être le plus informatif possible. En effet dans ces travaux, le raisonnement en nombre a été utilisé car il semblait le plus pertinent pour évaluer l'internalisation. Toutefois il est apparu beaucoup moins pertinent pour comparer l'activité biologique des nanoparticules dans la gamme de taille 150-850 nm.

Les résultats obtenus pour les nanoparticules de 250 et 500 nm se sont avérés en accord avec les observations faites sur ces mêmes tailles avec ou sans pHrodo de la deuxième publication. Ces deux tailles présentent des taux d'internalisation intracellulaire comparables. Il conviendrait d'élargir cette gamme de taille vers des valeurs plus basses. De plus, afin de compléter ce travail réalisé sur un modèle de lignée *in vitro* de macrophages murins, il conviendrait de se rapprocher des conditions *in vivo* chez l'homme en complétant les analyses avec des macrophages humains provenant de lavages broncho-alvéolaires (aspect *ex vivo*) afin de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques réelles.

Les résultats obtenus au cours de la première partie de ces travaux ont mis en évidence l'importance des voies d'internalisation empruntées par les particules. En effet nous avons observé que les particules pouvaient être internalisées par le biais de mécanismes indépendants de l'actine grâce à l'utilisation d'inhibiteurs tels que la cytochalasine-D, la jasplakinolide et la latrunculine. Il serait très intéressant de compléter la seconde partie de notre étude avec les nanoparticules de tailles différentes grâce à l'utilisation de ces mêmes inhibiteurs mais aussi en complétant les analyses par l'investigation de différentes voies d'internalisation (**Hillaireau and Couvreur, 2009**, **Zhang and Monteiro-Riviere, 2009**). En effet, la mécanistique des phénomènes d'internalisation semble être fortement dépendante de la taille des corps étrangers (**Rejman et al., 2004**). De plus la phagocytose est un mécanisme prépondérant chez les macrophages mais pas pour d'autres lignées cellulaires telles que les lymphocytes avec lesquels nous souhaitons travailler dans l'avenir. En ce sens, il aurait été intéressant d'étudier plus en détail les voies d'internalisation et notamment les voies dépendantes de l'actine grâce aux inhibiteurs tels qu'ils ont été décrits dans la première publication, mais aussi de réaliser une étude fonctionnelle plus poussée des différentes voies d'internalisation (endocytose, pinocytose, etc.) avec d'autres inhibiteurs spécifiques tels que le nocodazole et la chlorpromazine (**Linder et al., 2000**, **Moller et al., 2002**).

Concernant les évaluations de l'activité biologique, certaines améliorations pourraient aussi être apportées, par rapport à l'existant. En effet, outre le TNF- α , il serait intéressant de quantifier la production d'autres cytokines tels que l'interleukine-6 qui intervient au niveau des phénomènes d'inflammation aiguë et chronique, mais aussi potentiellement des interleukines-8 et -10 (**Feghali and Wright, 1997**). Le développement de ces analyses est prévu au laboratoire en parallèle de la mise en place du test des comètes (détection des altérations primaires de l'ADN) pouvant apporter des informations sur l'évaluation complémentaire de la génotoxicité (**Cakmak et al., 2004**), considérée comme incontournable dans les études de nanotoxicologie et les programmes de recherche réalisés dans le domaine ou sur les recommandations de l'AFSSAPS. Enfin, l'étude de l'apoptose (mort cellulaire programmée) devrait venir se superposer aux études de génotoxicité et compléter le dosage de la LDH déjà effectif (**Riccardi and Nicoletti, 2006**). Dans ce contexte, une étude de l'activité pan-caspase associée à un niveau d'activité plus spécifique de la caspase-3 pourrait constituer des données supplémentaires et informatives pour les analyses de particules montrant une cytotoxicité significative.

Les données de la littérature évoluant très rapidement dans le domaine « nano », des études commencent à voir le jour sur l'impact de l'internalisation de nanoparticules sur le comportement du cycle cellulaire (**Su et al., 2010**). Ce paramètre apparaît important et encore peu étudié. Nous avons observé en vidéomicroscopie que les cellules semblaient se répartir les particules micrométriques internalisées, de plus au cours de chacune de nos analyses morphologiques après cyto centrifugation et coloration MGG, pour chaque taille de nanoparticules, des figures de cellules en cours de division pouvaient être observées (métaphase et anaphase entre autres). Il pourrait être intéressant de compléter nos études en réalisant des cinétiques d'internalisation des nanoparticules au cours du temps jusqu'à 48h en parallèle d'un marqueur du cycle cellulaire type. Ainsi il serait possible de déterminer la proportion de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire et voir si les nanoparticules perturbent ou non cette répartition.

Enfin, il a été nécessaire pour ce type de thématique de mettre au point des méthodologies d'analyses standardisées et multiparamétriques. Il fallait dans un premier temps travailler avec des nanoparticules bien caractérisées au niveau physico-chimique. L'ensemble de ces travaux s'est accordé avec les données de la littérature sur l'impact de la physico-chimie de la particule sur les phénomènes d'internalisation et les données d'activité biologique. Ces aspects sont résumés dans la **Figure 65**.

Observation

- Morphologie (MGG)
- Confocal (marqueurs fluorescents)
- MEB (aspects de surface)
- MET (localisation intracellulaire)

Quantification

- Cytométrie en flux et Fluorimétrie
Quenching au bleu trypan :
Distinction entre les nanoparticules
adhérées et internalisées
- Microscopie confocale
Nanoparticules pHrodo

Internalisation

Développement des
outils
Réflexion sur les
doses de NP et les
métriques

Physico- chimie

- Taille
- Potentiel Zeta
- Groupements chimiques
de surface (charge)
- Fluorescence

Toxicité

- Inflammation : TNF- α
- Cytotoxicité : LDH
- Stress oxydant

Figure 65 : Schéma bilan des paramètres physico-chimiques contrôlés des nanoparticules, des outils d'étude de l'internalisation cellulaire et des tests de toxicité mis en place dans ces travaux de thèse.

Ces travaux ont permis de structurer des techniques d'étude grâce au développement d'outils de quantification de l'internalisation et de méthodologies d'évaluation des paramètres physico-chimiques mais aussi de l'activité biologique nécessaires pour ce type d'étude interdisciplinaire. Il convient à l'heure actuelle de standardiser et d'effectuer une évaluation biologique de la toxicité la plus complète possible. Dans ce sens les analyses que nous avons réalisées semblent être requises au minimum (TNF- α , LDH et stress oxydant), et devraient être complétées par une évaluation plus ciblée de l'apoptose et de la génotoxicité.

Cette base de travail va maintenant pouvoir être utilisée pour d'autres évaluations au sein de l'équipe.

Ainsi, suite aux résultats préliminaires encourageants sur « l'effet charge » des nanoparticules, les travaux de collaboration seront poursuivis par une nouvelle doctorante au laboratoire (Andréa Kurtz-Chalot). Les charges des nanoparticules modèles, de taille fixée à 40-60 nm, devraient être étendues (positives, négatives et neutres). De plus, des analyses devraient être réalisées en parallèle sur des cellules dendritiques en collaboration avec l'équipe Grenobloise du Dr. C. Villiers (Institut Albert Bonniot Inserm/UJF U823) afin de prendre également en compte les différences de

comportement de ces deux types cellulaires impliqués en première ligne dans les interactions avec des particules antigéniques. Ainsi, l'objectif de cette nouvelle thèse vise à mieux comprendre les interactions entre l'internalisation, la physico-chimie des nanoparticules et leur activité biologique en prenant en compte de nouvelles données (charge des nanoparticules).

Dans ce cadre, des données récentes de la littérature sur le concept de « corona » émergent et impliquent de prendre en compte pour nos investigations futures, outre les paramètres physico-chimiques, ce phénomène d'adsorption de biomolécules sur les nanoparticules (**Lundqvist et al., 2008, Lynch et al., 2007**). La couronne de protéines adsorbées à la surface des nanoparticules en milieu biologique tel que le milieu de culture pourrait modifier la charge et donc l'état de stabilité. Le développement de méthodologies d'analyses de l'effet de la charge des nanoparticules devra tenir compte de ce phénomène important. Il conviendra de vérifier les modifications de charge au cours du temps dans les analyses futures. Ce phénomène constituera le point central de cette nouvelle thèse comme le montre la **Figure 66**.

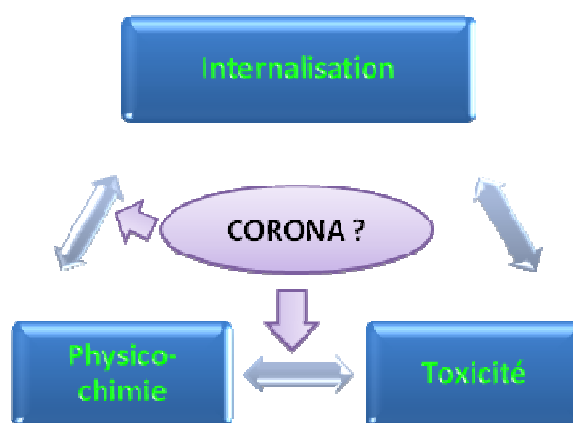


Figure 66 : Diagramme représentant l'objectif des liens à établir pour poursuivre sur cette thématique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ABSOLOM, D. R. 1986. Basic methods for the study of phagocytosis. *Methods Enzymol*, 132, 95-180.
- ADAMS, J. C. 2002. Molecular organisation of cell-matrix contacts: essential multiprotein assemblies in cell and tissue function. *Expert Rev Mol Med*, 4, 1-24.
- ADEREM, A. & UNDERHILL, D. M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593-623.
- AFSSAPS Février 2011. Rapport NanoDM (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) Evaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanoparticules. Version 5 finale.
- AFSSET 2006. Avis de l'Afsset (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). Rapport du groupe d'experts. Les nanomatériaux. Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement.
- AFSSET 2008. Avis de l'Afsset (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). Rapport d'expertise collective. Les nanomatériaux. Sécurité au travail.
- AHSAN, F., RIVAS, I. P., KHAN, M. A. & TORRES SUAREZ, A. I. 2002. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages. *J Control Release*, 79, 29-40.
- AKIYAMA, I., OGAMI, A., OYABU, T., YAMATO, H., MORIMOTO, Y. & TANAKA, I. 2003. Clearance of deposited silicon carbide whisker from rat lungs inhaled during a 4-week exposure. *J Occup Health*, 45, 31-5.
- ALLEN, L. A. & ADEREM, A. 1996. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol*, 8, 36-40.
- ALVAREZ-ROMAN, R., NAIK, A., KALIA, Y. N., GUY, R. H. & FESSI, H. 2004. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*, 99, 53-62.
- ANDOH, A., FUJIYAMA, Y., KITO, K., HODOHARA, K., BAMBA, T. & HOSODA, S. 1991. Flow cytometric assay for phagocytosis of human monocytes mediated via Fc gamma-receptors and complement receptor CR1 (CD35). *Cytometry*, 12, 677-86.
- ANDUJAR, P., LANONE, S., BROCHARD, P. & BOCZKOWSKI, J. 2009. Respiratory effects of manufactured nanoparticles. *Rev Mal Respir*, 26, 625-37.
- ARNIDA, JANAT-AMSBURY, M. M., RAY, A., PETERSON, C. M. & GHANDEHARI, H. 2011. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 417-23.
- BACHOUAL, R., BOCZKOWSKI, J., GOVEN, D., AMARA, N., TABET, L., ON, D., LECON-MALAS, V., AUBIER, M. & LANONE, S. 2007. Biological effects of particles from the paris subway system. *Chem Res Toxicol*, 20, 1426-33.

- BALDUZZI, M., DIOCIAIUTI, M., DE BERARDIS, B., PARADISI, S. & PAOLETTI, L. 2004. In vitro effects on macrophages induced by noncytotoxic doses of silica particles possibly relevant to ambient exposure. *Environ Res*, 96, 62-71.
- BALL, B. R., SMITH, K. R., VERANTH, J. M. & AUST, A. E. 2000. Bioavailability of iron from coal fly ash: mechanisms of mobilization and of biological effects. *Inhal Toxicol*, 12 Suppl 4, 209-25.
- BARREDA, D. R., NEUMANN, N. F. & BELOSEVIC, M. 2000. Flow cytometric analysis of PKH26-labeled goldfish kidney-derived macrophages. *Dev Comp Immunol*, 24, 395-406.
- BASSOE, C. F., LI, N., RAGHEB, K., LAWLER, G., STURGIS, J. & ROBINSON, J. P. 2003. Investigations of phagosomes, mitochondria, and acidic granules in human neutrophils using fluorescent probes. *Cytometry B Clin Cytom*, 51, 21-9.
- BEAMER, C. A. & HOLIAN, A. 2005. Scavenger receptor class A type I/II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, L186-95.
- BINKER, M. G., ZHAO, D. Y., PANG, S. J. & HARRISON, R. E. 2007. Cytoplasmic linker protein-170 enhances spreading and phagocytosis in activated macrophages by stabilizing microtubules. *J Immunol*, 179, 3780-91.
- BOS, H. & DE SOUZA, W. 2000. Phagocytosis of yeast: a method for concurrent quantification of binding and internalization using differential interference contrast microscopy. *J Immunol Methods*, 238, 29-43.
- BOUMAHD, N. 2009. Approche pluridisciplinaire de l'étude de l'activité biologique de particules fines. *These*.
- BROWN, J. S., ZEMAN, K. L. & BENNETT, W. D. 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 1240-7.
- BROZ, P., DRIAMOV, S., ZIEGLER, J., BEN-HAIM, N., MARSCH, S., MEIER, W. & HUNZIKER, P. 2006. Toward intelligent nanosize bioreactors: a pH-switchable, channel-equipped, functional polymer nanocontainer. *Nano Lett*, 6, 2349-53.
- BRUCH, J., REHN, S., REHN, B., BORM, P. J. & FUBINI, B. 2004. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 203-16.
- BUCK, S. M., XU, H., BRASUEL, M., PHILBERT, M. A. & KOPELMAN, R. 2004. Nanoscale probes encapsulated by biologically localized embedding (PEBBLEs) for ion sensing and imaging in live cells. *Talanta*, 63, 41-59.

- CAKMAK, G. D., SCHINS, R. P., SHI, T., FENOGLIO, I., FUBINI, B. & BORM, P. J. 2004. In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 105-13.
- CASTELLANO, F., CHAVRIER, P. & CARON, E. 2001. Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol*, 13, 347-55.
- CATELAS, I., PETIT, A., MARCHAND, R., ZUKOR, D. J., YAHIA, L. & HUK, O. L. 1999. Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles in vitro. *J Bone Joint Surg Br*, 81, 516-21.
- CHAMPION, J. A., WALKER, A. & MITRAGOTRI, S. 2008. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. *Pharm Res*.
- CHIMINI, G. & CHAVRIER, P. 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol*, 2, E191-6.
- CHITHRANI, B. D., GHAZANI, A. A. & CHAN, W. C. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*, 6, 662-8.
- CHO, E. C., XIE, J., WURM, P. A. & XIA, Y. 2009. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Lett*, 9, 1080-4.
- CLARK, H. A., HOYER, M., PHILBERT, M. A. & KOPELMAN, R. 1999a. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 1. Fabrication, characterization, and methods for intracellular delivery of PEBBLE sensors. *Anal Chem*, 71, 4831-6.
- CLARK, H. A., KOPELMAN, R., TJALKENS, R. & PHILBERT, M. A. 1999b. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 2. Sensors for pH and calcium and the intracellular application of PEBBLE sensors. *Anal Chem*, 71, 4837-43.
- CLIFT, M. J., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., BROWN, D. M., DUFFIN, R., DONALDSON, K., PROUDFOOT, L., GUY, K. & STONE, V. 2008. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 232, 418-27.
- COFFEY, G. P., FOX, J. A., PIPPIG, S., PALMIERI, S., REITZ, B., GONZALES, M., BAKSHI, A., PADILLA-EAGAR, J. & FIELDER, P. J. 2005. Tissue distribution and receptor-mediated clearance of anti-CD11a antibody in mice. *Drug Metab Dispos*, 33, 623-9.
- CONNER, S. D. & SCHMID, S. L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44.

- DE LA HARPE, J. & NATHAN, C. F. 1985. A semi-automated micro-assay for H₂O₂ release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Immunol Methods*, 78, 323-36.
- DE OLIVEIRA, C. A. & MANTOVANI, B. 1988. Latrunculin A is a potent inhibitor of phagocytosis by macrophages. *Life Sci*, 43, 1825-30.
- DEFIFE, K. M., JENNEY, C. R., COLTON, E. & ANDERSON, J. M. 1999. Disruption of filamentous actin inhibits human macrophage fusion. *Faseb J*, 13, 823-32.
- DI PALMA, F., CHAMSON, A., LAFAGE-PROUST, M. H., JOUFFRAY, P., SABIDO, O., PEYROCHE, S., VICO, L. & RATTNER, A. 2004. Physiological strains remodel extracellular matrix and cell-cell adhesion in osteoblastic cells cultured on alumina-coated titanium alloy. *Biomaterials*, 25, 2565-75.
- DOBROVOLSKAIA, M. A., AGGARWAL, P., HALL, J. B. & MCNEIL, S. E. 2008. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*, 5, 487-95.
- DONALDSON, K., BROWN, D., CLOUTER, A., DUFFIN, R., MACNEE, W., RENWICK, L., TRAN, L. & STONE, V. 2002. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med*, 15, 213-20.
- DONALDSON, K. & STONE, V. 2003. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita*, 39, 405-10.
- DONALDSON, K., STONE, V., BORM, P. J., JIMENEZ, L. A., GILMOUR, P. S., SCHINS, R. P., KNAAPEN, A. M., RAHMAN, I., FAUX, S. P., BROWN, D. M. & MACNEE, W. 2003. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radic Biol Med*, 34, 1369-82.
- DONALDSON, K., STONE, V., CLOUTER, A., RENWICK, L. & MACNEE, W. 2001. Ultrafine particles. *Occup Environ Med*, 58, 211-6, 199.
- DRESCHER, D., ORTS-GIL, G., LAUBE, G., NATTE, K., VEH, R. W., OSTERLE, W. & KNEIPP, J. 2011. Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. *Anal Bioanal Chem*, 400, 1367-73.
- DURAND, M., POURCHEZ, J., LOUIS, B., POUGET, J. F., ISABEY, D., COSTE, A., PRADES, J. M., RUSCH, P. & COTTIER, M. 2011. Plastinated nasal model: a new concept of anatomically realistic cast. *Rhinology*, 49, 30-6.

- DURAND, M., RUSCH, P., GRANJON, D., CHANTREL, G., PRADES, J. M., DUBOIS, F., ESTEVE, D., POUGET, J. F. & MARTIN, C. 2001. Preliminary study of the deposition of aerosol in the maxillary sinuses using a plastinated model. *J Aerosol Med*, 14, 83-93.
- EHRENBERG, M. S., FRIEDMAN, A. E., FINKELSTEIN, J. N., OBERDORSTER, G. & MCGRATH, J. L. 2009. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials*, 30, 603-10.
- ELIAS, Z., POIROT, O., DANIERE, M. C., TERZETTI, F., MARANDE, A. M., DZWIGAJ, S., PEZERAT, H., FENOGLIO, I. & FUBINI, B. 2000. Cytotoxic and transforming effects of silica particles with different surface properties in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicol In Vitro*, 14, 409-22.
- ENG, E. W., BETTIO, A., IBRAHIM, J. & HARRISON, R. E. 2007. MTOC reorientation occurs during FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol Biol Cell*, 18, 2389-99.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S. & HALL, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420, 629-35.
- FADOK, V. A. 1999. Clearance: the last and often forgotten stage of apoptosis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 4, 203-11.
- FAURE, A. C., DUFORT, S., JOSSERAND, V., PERRIAT, P., COLL, J. L., ROUX, S. & TILLEMENT, O. 2009. Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small*, 5, 2565-75.
- FEGHALI, C. A. & WRIGHT, T. M. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 2, d12-26.
- FENTEANY, G. & GLOGAUER, M. 2004. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol*, 11, 15-24.
- FERIN, J., OBERDORSTER, G. & PENNEY, D. P. 1992. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6, 535-42.
- FIZET, J., RIVIÈRE, C., BRIDOT, J. L., CHARVET, N., LOUIS, C., BILLOTEY, C., RACCURT, M., MOREL, G., ROUX, S., PERRIAT, P. & TILLEMENT, O. 2009. Multi-luminescent hybrid gadolinium oxide nanoparticles as potential cell labeling. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.
- FUBINI, B. 1998. Surface chemistry and quartz hazard. *Ann Occup Hyg*, 42, 521-30.
- FUBINI, B., FENOGLIO, I., CESCINO, R., GHIAZZA, M., MARTRA, G., TOMATIS, M., BORM, P., SCHINS, R. & BRUCH, J. 2004. Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 89-104.

- FUBINI, B., GHIAZZA, M. & FENOGLIO, I. 2010. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*, 4, 347-63.
- FUBINI, B. & HUBBARD, A. 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*, 34, 1507-16.
- FUNAHASHI, A., SCHLUETER, D. P., PINTAR, K. & SIEGESMUND, K. A. 1984. Value of in situ elemental microanalysis in the histologic diagnosis of silicosis. *Chest*, 85, 506-9.
- GAMBELLI, F., DI, P., NIU, X., FRIEDMAN, M., HAMMOND, T., RICHES, D. W. & ORTIZ, L. A. 2004. Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor 1 (p55) protects macrophages from silica-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 2020-9.
- GEIGER, B. & BERSHADSKY, A. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 584-92.
- GEISER, M. 2010. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 23, 207-17.
- GEISER, M. & KREYLING, W. G. 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*, 7, 2.
- GEISER, M., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., KAPP, N., SCHURCH, S., KREYLING, W., SCHULZ, H., SEMMLER, M., IM HOF, V., HEYDER, J. & GEHR, P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect*, 113, 1555-60.
- GENG, H., MENG, Z. & ZHANG, Q. 2006. In vitro responses of rat alveolar macrophages to particle suspensions and water-soluble components of dust storm PM(2.5). *Toxicol In Vitro*, 20, 575-84.
- GILBERTI, R. M., JOSHI, G. N. & KNECHT, D. A. 2008. The phagocytosis of crystalline silica particles by macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39, 619-27.
- GILLINGHAM, A. K. & MUNRO, S. 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 579-611.
- GOLDSMITH, C. A., FREVERT, C., IMRICH, A., SIOUTAS, C. & KOBZIK, L. 1997. Alveolar macrophage interaction with air pollution particulates. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 5, 1191-5.
- GONZALEZ, J. B., ORTH, M., SCHAEFER, M. & TAUBER, R. 2006. Endocytosis and intracellular trafficking of fatty acid esters of phenylaminopropanediol, the putative etiologic agents of the toxic oil syndrome (TOS). *Toxicol Lett*, 163, 206-12.
- GOUTAYER, M. 2008. Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo. *These*.

- GOVERNA, M., AMATI, M., FENOGLIO, I., VALENTINO, M., COLOCCINI, S., BOLOGNINI, L., CARLO BOTTA, G., EMANUELLI, M., PIERELLA, F., VOLPE, A. R., ASTOLFI, P., CARMIGNANI, M. & FUBINI, B. 2005. Variability of biological effects of silicas: different degrees of activation of the fifth component of complement by amorphous silicas. *Toxicol Appl Pharmacol*, 208, 68-77.
- GOZAL, E., ORTIZ, L. A., ZOU, X., BUROW, M. E., LASKY, J. A. & FRIEDMAN, M. 2002. Silica-induced apoptosis in murine macrophage: involvement of tumor necrosis factor-alpha and nuclear factor-kappaB activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27, 91-8.
- GRATTON, S. E., ROPP, P. A., POHLHAUS, P. D., LUFT, J. C., MADDEN, V. J., NAPIER, M. E. & DESIMONE, J. M. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11613-8.
- GRIFFITHS, G. 2004. On phagosome individuality and membrane signalling networks. *Trends Cell Biol*, 14, 343-51.
- GWINN, M. R. & VALLYATHAN, V. 2006. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 9, 27-39.
- HABERZETTL, P., DUFFIN, R., KRAMER, U., HOHR, D., SCHINS, R. P., BORM, P. J. & ALBRECHT, C. 2007. Actin plays a crucial role in the phagocytosis and biological response to respirable quartz particles in macrophages. *Arch Toxicol*, 81, 459-70.
- HALL, A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans*, 33, 891-5.
- HAMILTON, R. F., JR., THAKUR, S. A. & HOLIAN, A. 2008. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med*, 44, 1246-58.
- HAMILTON, R. F., JR., THAKUR, S. A., MAYFAIR, J. K. & HOLIAN, A. 2006. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *J Biol Chem*, 281, 34218-26.
- HARVEY, B. P., QUAN, T. E., RUDENGA, B. J., ROMAN, R. M., CRAFT, J. & MAMULA, M. J. 2008. Editing antigen presentation: antigen transfer between human B lymphocytes and macrophages mediated by class A scavenger receptors. *J Immunol*, 181, 4043-51.
- HAYASHI, H. & KAJITA, A. 1988. Silicon carbide in lung tissue of a worker in the abrasive industry. *Am J Ind Med*, 14, 145-55.
- HE, C., HU, Y., YIN, L., TANG, C. & YIN, C. 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31, 3657-66.
- HECKEL, K., KIEFMANN, R., DORGER, M., STOECKELHUBER, M. & GOETZ, A. E. 2004. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287, L867-78.

- HED, J. 1986. Methods for distinguishing ingested from adhering particles. *Methods Enzymol*, 132, 198-204.
- HED, J., HALLDEN, G., JOHANSSON, S. G. & LARSSON, P. 1987. The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods*, 101, 119-25.
- HERVÉ-BAZIN, B. E. C. 2007. Les nanoparticules - Un enjeu majeur pour la santé au travail ? *EDP Sciences*.
- HILLAIREAU, H. & COUVREUR, P. 2009. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2873-96.
- HMAMA, Z., SENDIDE, K., TALAL, A., GARCIA, R., DOBOS, K. & REINER, N. E. 2004. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Cell Sci*, 117, 2131-40.
- HORCAJADA, P., SERRE, C., FERREY, G., COUVREUR, P. & GREF, R. 2010. Hybrid nanocarriers for controlled delivery of antitumour and retroviral drugs delivery. *Med Sci (Paris)*, 26, 761-7.
- HOSHINO, A., MANABE, N., FUJIOKA, K., SUZUKI, K., YASUHARA, M. & YAMAMOTO, K. 2007. Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity. *J Artif Organs*, 10, 149-57.
- HOTCHIN, N. A. & HALL, A. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol*, 131, 1857-65.
- HU, Y., XIE, J., TONG, Y. W. & WANG, C. H. 2007. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. *J Control Release*, 118, 7-17.
- IBRAHIM-GRANET, O., PHILIPPE, B., BOLETI, H., BOISVIEUX-ULRICH, E., GRENET, D., STERN, M. & LATGE, J. P. 2003. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun*, 71, 891-903.
- JACOBS, D. B. & PIPHO, C. 1983. Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells. *J Immunol Methods*, 62, 101-8.
- JAMIESON, T., BAKHSHI, R., PETROVA, D., POCOCK, R., IMANI, M. & SEIFALIAN, A. M. 2007. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, 28, 4717-32.

- JOHNSTON, C. J., DRISCOLL, K. E., FINKELSTEIN, J. N., BAGGS, R., O'REILLY, M. A., CARTER, J., GELEIN, R. & OBERDORSTER, G. 2000. Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci*, 56, 405-13.
- JONES, G. E. 2000. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc Biol*, 68, 593-602.
- KANNO, S., FURUYAMA, A. & HIRANO, S. 2007. A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. *Toxicol Sci*, 97, 398-406.
- KARNOVSKY, M. L. & BADWEY, J. A. 1986. Respiratory burst during phagocytosis: an overview. *Methods Enzymol*, 132, 353-4.
- KENDALL, M., BROWN, L. & TROUGHT, K. 2004. Molecular adsorption at particle surfaces: a PM toxicity mediation mechanism. *Inhal Toxicol*, 16 Suppl 1, 99-105.
- KENDALL, M., DING, P. & KENDALL, K. 2011. Particle and nanoparticle interactions with fibrinogen: the importance of aggregation in nanotoxicology. *Nanotoxicology*, 5, 55-65.
- KLEIN, J. 2011. Evaluation de la charge nanoparticulaire dans le plasma séminal humain. Impact sur la fertilité masculine. *These*.
- KOBAYASHI, S., KOJIDANI, T., OSAKADA, H., YAMAMOTO, A., YOSHIMORI, T., HIRAOKA, Y. & HARAGUCHI, T. 2010. Artificial induction of autophagy around polystyrene beads in nonphagocytic cells. *Autophagy*, 6, 36-45.
- KOBZIK, L. 1995. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J Immunol*, 155, 367-76.
- KREYLING, W. G., SEMMLER-BEHNKE, M., SEITZ, J., SCYMCZAK, W., WENK, A., MAYER, P., TAKENAKA, S. & OBERDORSTER, G. 2009. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol*, 21 Suppl 1, 55-60.
- KREYLING, W. G., SEMMLER, M., ERBE, F., MAYER, P., TAKENAKA, S., SCHULZ, H., OBERDORSTER, G. & ZIESENIS, A. 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1513-30.
- LAMPROU, I., TSAKAS, S., THEODOROU, G. L., KARAKANTZA, M., LAMPROPOULOU, M. & MARMARAS, V. J. 2005. Uptake of LPS/E. coli/latex beads via distinct signalling pathways in medfly hemocytes: the role of MAP kinases activation and protein secretion. *Biochim Biophys Acta*, 1744, 1-10.

- LANONE, S., ROGERIEUX, F., GEYS, J., DUPONT, A., MAILLOT-MARECHAL, E., BOCZKOWSKI, J., LACROIX, G. & HOET, P. 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol*, 6, 14.
- LANZETTI, L. 2007. Actin in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 453-8.
- LECLERC, L., BOUDARD, D., POURCHEZ, J., FOREST, V., SABIDO, O., BIN, V., PALLE, S., GROSSEAU, P., BERNACHE, D. & COTTIER, M. 2010. Quantification of micro-sized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhal Toxicol*, 22, 1091-100.
- LEE, Y. E., SMITH, R. & KOPELMAN, R. 2009. Nanoparticle PEBBLE sensors in live cells and in vivo. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2, 57-76.
- LEHNERT, B. E. 1992. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. *Environ Health Perspect*, 97, 17-46.
- LIMBACH, L. K., LI, Y., GRASS, R. N., BRUNNER, T. J., HINTERMANN, M. A., MULLER, M., GUNTHER, D. & STARK, W. J. 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol*, 39, 9370-6.
- LINDER, S., HUFNER, K., WINTERGERST, U. & AEPFELBACHER, M. 2000. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci*, 113 Pt 23, 4165-76.
- LIPPMANN, M., YEATES, D. B. & ALBERT, R. E. 1980. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med*, 37, 337-62.
- LUNDQVIST, M., STIGLER, J., ELIA, G., LYNCH, I., CEDERVALL, T. & DAWSON, K. A. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14265-70.
- LYNCH, I., CEDERVALL, T., LUNDQVIST, M., CABALEIRO-LAGO, C., LINSE, S. & DAWSON, K. A. 2007. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv Colloid Interface Sci*, 134-135, 167-74.
- MAVON, A., MIQUEL, C., LEJEUNE, O., PAYRE, B. & MORETTO, P. 2007. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol*, 20, 10-20.
- MEIRING, J. J., BORM, P. J., BAGATE, K., SEMMLER, M., SEITZ, J., TAKENAKA, S. & KREYLING, W. G. 2005. The influence of hydrogen peroxide and histamine on lung

- permeability and translocation of iridium nanoparticles in the isolated perfused rat lung. *Part Fibre Toxicol*, 2, 3.
- MERHI, M., DOMBU, C. Y., BRIENT, A., CHANG, J., PLATEL, A., LE CURIEUX, F., MARZIN, D., NESSLANY, F. & BETBEDER, D. 2011. Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. *Int J Pharm*.
- MIKSA, M., KOMURA, H., WU, R., SHAH, K. G. & WANG, P. 2009. A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J Immunol Methods*, 342, 71-7.
- MOLLER, W., BROWN, D. M., KREYLING, W. G. & STONE, V. 2005. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. *Part Fibre Toxicol*, 2, 7.
- MOLLER, W., HOFER, T., ZIESENIS, A., KARG, E. & HEYDER, J. 2002. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*, 182, 197-207.
- MOON, I. S., CHO, S. J., JIN, I. & WALIKONIS, R. 2007. A simple method for combined fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mol Cells*, 24, 76-82.
- MOORE, N. M., SHEPPARD, C. L., BARBOUR, T. R. & SAKIYAMA-ELBERT, S. E. 2008. The effect of endosomal escape peptides on in vitro gene delivery of polyethylene glycol-based vehicles. *J Gene Med*, 10, 1134-49.
- MUNOZ JAVIER, A., KREFT, O., SEMMLING, M., KEMPTER, S., SKIRTACH, A. G., BRUNS, O. T., DEL PINO, P., BEDARD, M. F., RADLER, J., KAS, J., PLANK, C., SUKHORUKOV, G. B. & PARAK, W. J. 2008. Uptake of Colloidal Polyelectrolyte-Coated Particles and Polyelectrolyte Multilayer Capsules by Living Cells. *Advanced Materials*, 20, 4281-4287.
- NAN, A., BAI, X., SON, S. J., LEE, S. B. & GHANDEHARI, H. 2008. Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes. *Nano Lett*, 8, 2150-4.
- NEL, A., XIA, T., MADLER, L. & LI, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622-7.
- NEMMAR, A., HOET, P. H. & NEMERY, B. 2006. Translocation of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 114, A211-2; author reply A212-3.
- NEMMAR, A., HOET, P. H., VANQUICKENBORNE, B., DINSDALE, D., THOMEER, M., HOYLAERTS, M. F., VANBILLOEN, H., MORTELMANS, L. & NEMERY, B. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, 105, 411-4.

- NIEDERGANG, F. & CHAVRIER, P. 2004. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 422-8.
- NIEDERGANG, F. & CHAVRIER, P. 2005. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 291, 43-60.
- NIEDERGANG, F., COLUCCI-GUYON, E., DUBOIS, T., RAPOSO, G. & CHAVRIER, P. 2003. ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol*, 161, 1143-50.
- NUUTILA, J. & LILIUS, E. M. 2005. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A*, 65, 93-102.
- OBERDORSTER, G., ELDER, A. & RINDERKNECHT, A. 2009. Nanoparticles and the brain: cause for concern? *J Nanosci Nanotechnol*, 9, 4996-5007.
- OBERDORSTER, G., FERIN, J., GELEIN, R., SODERHOLM, S. C. & FINKELSTEIN, J. 1992. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 97, 193-9.
- OBERDORSTER, G., FERIN, J. & LEHNERT, B. E. 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 5, 173-9.
- OBERDORSTER, G., FINKELSTEIN, J. N., JOHNSTON, C., GELEIN, R., COX, C., BAGGS, R. & ELDER, A. C. 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*, 5-74; disc 75-86.
- OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E. & OBERDORSTER, J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113, 823-39.
- OBERDORSTER, G., SHARP, Z., ATUDOREI, V., ELDER, A., GELEIN, R., KREYLING, W. & COX, C. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 16, 437-45.
- OBERDORSTER, G., SHARP, Z., ATUDOREI, V., ELDER, A., GELEIN, R., LUNTS, A., KREYLING, W. & COX, C. 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1531-43.
- OCHOA, G. C., SLEPNEV, V. I., NEFF, L., RINGSTAD, N., TAKEI, K., DANIELL, L., KIM, W., CAO, H., MCNIVEN, M., BARON, R. & DE CAMILLI, P. 2000. A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol*, 150, 377-89.

- ODAKA, C., SANDERS, M. L. & CREWS, P. 2000. Jasplakinolide induces apoptosis in various transformed cell lines by a caspase-3-like protease-dependent pathway. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7, 947-52.
- OLIVEIRA, C. A., CHEDRAOUI, S. & MANTOVANI, B. 1997. Latrunculin A is a potent inducer of aggregation of polymorphonuclear leukocytes. *Life Sci*, 61, 603-9.
- OLIVEIRA, C. A., KASHMAN, Y. & MANTOVANI, B. 1996. Effects of latrunculin A on immunological phagocytosis and macrophage spreading-associated changes in the F-actin/G-actin content of the cells. *Chem Biol Interact*, 100, 141-53.
- ORTH, J. D. & MCNIVEN, M. A. 2003. Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 31-9.
- OSAKI, F., KANAMORI, T., SANDO, S., SERA, T. & AOYAMA, Y. 2004. A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region. *J Am Chem Soc*, 126, 6520-1.
- OSTIGUY, C., ROBERGE, B., WOODS, C. & SOUCY, B. 2010. Les nanoparticules de synthèse. Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. 2ème édition. *Substances chimiques et agents biologiques. Etudes et recherches. Rapport R-646*, 1-159.
- OSTIGUY, G. L. 1979. Summary of task force report on occupational respiratory disease (pneumoconiosis). *Can Med Assoc J*, 121, 414-6, 418-21.
- PAN, Y. L., CAI, J. Y., QIN, L. & WANG, H. 2006. Atomic force microscopy-based cell nanostructure for ligand-conjugated quantum dot endocytosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 38, 646-52.
- PARK, S., NAM, H., CHUNG, N., PARK, J. D. & LIM, Y. 2006. The role of iron in reactive oxygen species generation from diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro*, 20, 851-7.
- PENG, J., HE, X., WANG, K., TAN, W., WANG, Y. & LIU, Y. 2007. Noninvasive monitoring of intracellular pH change induced by drug stimulation using silica nanoparticle sensors. *Anal Bioanal Chem*, 388, 645-54.
- POWERS, K. A., SZASZI, K., KHADAROO, R. G., TAWADROS, P. S., MARSHALL, J. C., KAPUS, A. & ROTSTEIN, O. D. 2006. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med*, 203, 1951-61.
- RAVETCH, J. & ADEREM, A. 2007. Phagocytic cells. *Immunol Rev*, 219, 5-7.
- REIBETANZ, U., CHEN, M. H., MUTUKUMARASWAMY, S., LIAW, Z. Y., OH, B. H., VENKATRAMAN, S., DONATH, E. & NEU, B. 2010. Colloidal DNA carriers for direct localization in cell compartments by pH sensing. *Biomacromolecules*, 11, 1779-84.

- REIBETANZ, U., HALOZAN, D., BRUMEN, M. & DONATH, E. 2007. Flow cytometry of HEK 293T cells interacting with polyelectrolyte multilayer capsules containing fluorescein-labeled poly(acrylic acid) as a pH sensor. *Biomacromolecules*, 8, 1927-33.
- REJMAN, J., OBERLE, V., ZUHORN, I. S. & HOEKSTRA, D. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, 377, 159-69.
- RICCARDI, C. & NICOLETTI, I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1, 1458-61.
- ROMERO, G., ESTRELA-LOPIS, I., ZHOU, J., ROJAS, E., FRANCO, A., ESPINEL, C. S., FERNANDEZ, A. G., GAO, C., DONATH, E. & MOYA, S. E. 2010. Surface Engineered Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Intracellular Delivery: Uptake and Cytotoxicity-A Confocal Raman Microscopic Study. *Biomacromolecules*, 11, 2993-2999.
- RUH, H., KUHL, B., BRENNER-WEISS, G., HOPF, C., DIABATE, S. & WEISS, C. 2011. Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicol Lett*.
- SANT, S., POULIN, S. & HILDGEN, P. 2008. Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 87, 885-95.
- SAYES, C. M., REED, K. L. & WARHEIT, D. B. 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci*, 97, 163-80.
- SEILER, F., REHN, B., REHN, S. & BRUCH, J. 2004. Different toxic, fibrogenic and mutagenic effects of four commercial quartz flours in the rat lung. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 115-24.
- SEMMLING, M., KREFT, O., MUNOZ JAVIER, A., SUKHORUKOV, G. B., KAS, J. & PARAK, W. J. 2008. A novel flow-cytometry-based assay for cellular uptake studies of polyelectrolyte microcapsules. *Small*, 4, 1763-8.
- SERDA, R. E., GU, J., BHAVANE, R. C., LIU, X., CHIAPPINI, C., DECUZZI, P. & FERRARI, M. 2009a. The association of silicon microparticles with endothelial cells in drug delivery to the vasculature. *Biomaterials*, 30, 2440-8.
- SERDA, R. E., GU, J., BURKS, J. K., FERRARI, K., FERRARI, C. & FERRARI, M. 2009b. Quantitative mechanics of endothelial phagocytosis of silicon microparticles. *Cytometry A*, 75, 752-60.
- SIMON-DECKERS, A. 2008. Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques. *These*.

- SIMON, S. I. & SCHMID-SCHONBEIN, G. W. 1988. Biophysical aspects of microsphere engulfment by human neutrophils. *Biophys J*, 53, 163-73.
- SJÖBACK, R., NYGREN, J. & KUBISTA, M. 1995. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A*, 51, L7-L21.
- SKIRTACH, A. G., MUNOZ JAVIER, A., KREFT, O., KOHLER, K., PIERA ALBEROLA, A., MOHWALD, H., PARAK, W. J. & SUKHORUKOV, G. B. 2006. Laser-induced release of encapsulated materials inside living cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45, 4612-7.
- SONG, M. M., SONG, W. J., BI, H., WANG, J., WU, W. L., SUN, J. & YU, M. 2010. Cytotoxicity and cellular uptake of iron nanowires. *Biomaterials*, 31, 1509-17.
- STANTON, M. F., LAYNARD, M., TEGERIS, A., MILLER, E., MAY, M. & KENT, E. 1977. Carcinogenicity of fibrous glass: pleural response in the rat in relation to fiber dimension. *J Natl Cancer Inst*, 58, 587-603.
- STARK, W. J. 2011. Nanoparticles in biological systems. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50, 1242-58.
- STEINBERG, B. E., HUYNH, K. K. & GRINSTEIN, S. 2007. Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences. *Biochem Soc Trans*, 35, 1083-7.
- STEINKAMP, J. A., VALDEZ, Y. E. & LEHNERT, B. E. 2000. Flow cytometric, phase-resolved fluorescence measurement of propidium iodide uptake in macrophages containing phagocytized fluorescent microspheres. *Cytometry*, 39, 45-55.
- STEINKAMP, J. A., WILSON, J. S., SAUNDERS, G. C. & STEWART, C. C. 1982. Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science*, 215, 64-6.
- STERN, S. T. & MCNEIL, S. E. 2008. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol Sci*, 101, 4-21.
- STEWART, C. C., LEHNERT, B. E. & STEINKAMP, J. A. 1986. In vitro and in vivo measurement of phagocytosis by flow cytometry. *Methods Enzymol*, 132, 183-92.
- STRUNNIKOVA, N. V., BARB, J., SERGEEV, Y. V., THIAGARAJASUBRAMANIAN, A., SILVIN, C., MUNSON, P. J. & MACDONALD, I. M. 2009. Loss-of-function mutations in Rab escort protein 1 (REP-1) affect intracellular transport in fibroblasts and monocytes of choroideremia patients. *PLoS One*, 4, e8402.
- SU, Y., XU, J. Y., SHEN, P., LI, J., WANG, L., LI, Q., LI, W., XU, G. T., FAN, C. & HUANG, Q. 2010. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fulleranol in different cell lines. *Toxicology*, 269, 155-9.

- TERZANO, C., DI STEFANO, F., CONTI, V., GRAZIANI, E. & PETROIANNI, A. 2010. Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 14, 809-21.
- THIBODEAU, M. S., GIARDINA, C., KNECHT, D. A., HELBLE, J. & HUBBARD, A. K. 2004. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol Sci*, 80, 34-48.
- THIELE, L., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., JILEK, S., WUNDERLI-AlLENSPACH, H., MERKLE, H. P. & WALTER, E. 2001. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release*, 76, 59-71.
- TINKLE, S. S., ANTONINI, J. M., RICH, B. A., ROBERTS, J. R., SALMEN, R., DEPREE, K. & ADKINS, E. J. 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect*, 111, 1202-8.
- TORCHE, A. M., ALBINA, E., LE CORRE, P., JESTIN, A. & LE VERGE, R. 1999. Flow cytometric and optical microscopic evaluation of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres phagocytosis by pig alveolar macrophages. *J Control Release*, 58, 289-301.
- TSUBOI, S. & MEERLOO, J. 2007. Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. *J Biol Chem*, 282, 34194-203.
- TSUJI, J. S., MAYNARD, A. D., HOWARD, P. C., JAMES, J. T., LAM, C. W., WARHEIT, D. B. & SANTAMARIA, A. B. 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci*, 89, 42-50.
- VAL, S., HUSSAIN, S., BOLAND, S., HAMEL, R., BAEZA-SQUIBAN, A. & MARANO, F. 2009. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhal Toxicol*, 21 Suppl 1, 115-22.
- VAN AMERSFOORT, E. S. & VAN STRIJP, J. A. 1994. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry*, 17, 294-301.
- VAN BLAADEREN, A. & VRIJ, A. 1992. Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres. *Langmuir*.
- VAN OSS, C. J. 1986. Phagocytosis: an overview. *Methods Enzymol*, 132, 3-15.
- VANDERSLICE, W. E. & COLLINS, J. L. 1991. Differences in the tumor necrosis factor- α -mediated lysis by fixed natural cytotoxic cells and fixed cytotoxic macrophages. *J Immunol*, 146, 156-61.

- VERHOEF, J. & WALDVOGEL, F. A. 1985. Testing phagocytic cell function. *Eur J Clin Microbiol*, 4, 379-81.
- VIEIRA, O. V., BUCCI, C., HARRISON, R. E., TRIMBLE, W. S., LANZETTI, L., GRUENBERG, J., SCHREIBER, A. D., STAHL, P. D. & GRINSTEIN, S. 2003. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, 23, 2501-14.
- WANG, B., FENG, W. Y., WANG, T. C., JIA, G., WANG, M., SHI, J. W., ZHANG, F., ZHAO, Y. L. & CHAI, Z. F. 2006. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol Lett*, 161, 115-23.
- WANG, W., GU, B., LIANG, L. & HAMILTON, W. 2003. Fabrication of Two- and Three-Dimensional Silica Nanocolloidal Particle Arrays. *The Journal of Physical Chemistry B*.
- WARHEIT, D. B. 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci*, 101, 183-5.
- WARHEIT, D. B. 2010. Debunking Some Misconceptions about Nanotoxicology. *Nano Lett*, 4777-4782.
- WARHEIT, D. B., LAURENCE, B. R., REED, K. L., ROACH, D. H., REYNOLDS, G. A. & WEBB, T. R. 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci*, 77, 117-25.
- WARHEIT, D. B., WEBB, T. R., COLVIN, V. L., REED, K. L. & SAYES, C. M. 2007. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci*, 95, 270-80.
- WATANABE, M., OKADA, M., KUDO, Y., TONORI, Y., NIITSUYA, M., SATO, T., AIZAWA, Y. & KOTANI, M. 2002. Differences in the effects of fibrous and particulate titanium dioxide on alveolar macrophages of Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1047-60.
- WITSCHGER, O. & FABRIÈS, J. F. 2005. Particules ultrafines et santé au travail. 1 - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *INRS - Hygiène et sécurité du travail*, Cahier de notes documentaires, 21/35.
- YACOBI, N. R., MALMSTADT, N., FAZLOLLAHI, F., DEMAIO, L., MARCHELLETTA, R., HAMM-ALVAREZ, S. F., BOROK, Z., KIM, K. J. & CRANDALL, E. D. 2010. Mechanisms of alveolar epithelial translocation of a defined population of nanoparticles. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42, 604-14.

- YAN, F., ZHANG, C., ZHENG, Y., MEI, L., TANG, L., SONG, C., SUN, H. & HUANG, L. 2010. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine*, 6, 170-8.
- YANG, W., PETERS, J. I. & WILLIAMS, R. O., 3RD 2008. Inhaled nanoparticles--a current review. *Int J Pharm*, 356, 239-47.
- YEUNG, T. & GRINSTEIN, S. 2007. Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol Rev*, 219, 17-36.
- ZEYONS, O. 2008. Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. *These*.
- ZHANG, L. W. & MONTEIRO-RIVIERE, N. A. 2009. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Toxicol Sci*, 110, 138-55.
- ZIEGLER, W. H., LIDDINGTON, R. C. & CRITCHLEY, D. R. 2006. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol*, 16, 453-60.

ANNEXES

I. Culture cellulaire de macrophages

Quel que soit le modèle de particules utilisé (microparticules ou nanoparticules) les contacts et évaluations en conditions cellulaires ont tous été réalisés avec la lignée cellulaire de monocytes-macrophages RAW 264.7.

La lignée cellulaire RAW 264.7 (ATCC Cell Biology Collection LGC Promochem) est une lignée de macrophages de souris transformée par le virus AMLV (Abelson Murine Leukemia Virus).

Après décongélation des cellules conservées en azote liquide, la lignée a été cultivée dans une étuve à 37°C sous 5% de CO₂ dans des flasques de culture de 25 cm² ou 75 cm² contenant respectivement 8 mL ou 25 mL de milieu de culture selon les besoins en matériel cellulaire. Le milieu de culture est composé de 10 mL de sérum de veau fœtal (SVF 10%) décomplémenté (Gibco), 1 mL de pénicilline-streptomycine (pénicilline à 10 000 unités/mL, streptomycine à 10 mg/mL ; Sigma), dans 100 mL de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Gibco).

Comme ces cellules sont adhérentes, lorsqu'elles atteignent la confluence (deux fois par semaine) elles ont été décollées avec un grattoir en plastique stérile (Falcon) et remises en culture à la concentration de 2 millions de cellules par flasque. Un nouvel aliquot a été décongelé après 15 passages des cellules en culture, afin d'éviter une dérive phénotypique, ou dès que les cultures présentaient une modification morphologique ou des altérations suspectes.

L'aspect morphologique normal de ces cellules après cytocentrifugation et coloration MGG ainsi que l'aspect en MEB est présenté sur la **Figure 67**.

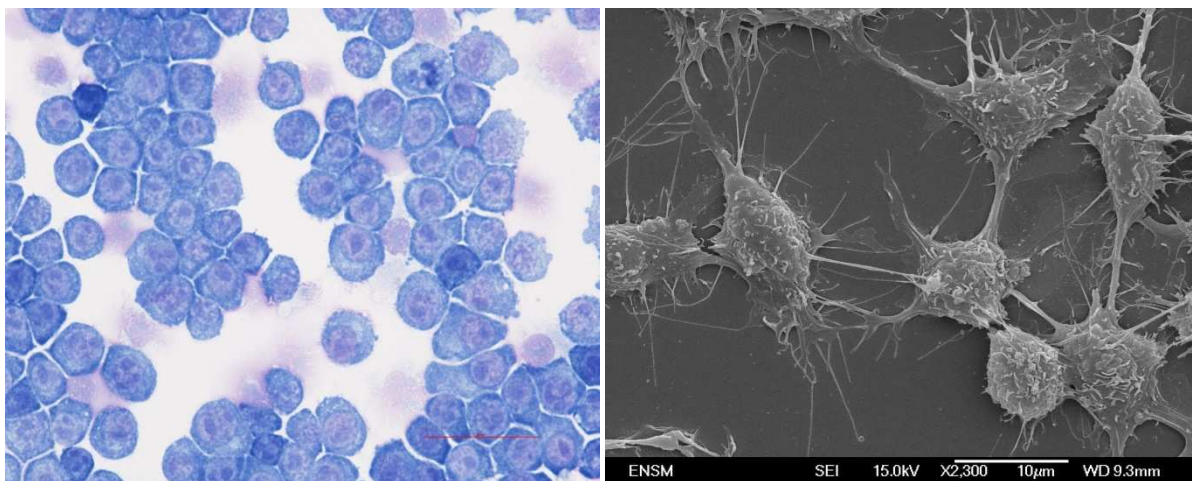


Figure 67 : Observations de la lignée de macrophages RAW 264.7 après coloration MGG (objectif x40) et après préparation et observation en MEB.

II. Techniques de microscopie

Différents types de microscopie ont été utilisés : la microscopie optique, à épifluorescence, confocale, électronique à transmission, électronique à balayage et la vidéomicroscopie.

Pour la **microscopie photonique**, l'appareil était un microscope Nikon éclipse 80i couplé à une caméra CCD. Au préalable les cellules subissaient une préparation histologique standard. 100 000 cellules étaient déposées sur lame par la technique de cyto centrifugation, puis colorées par la méthode de May-Grünwald-Giemsa (MGG). Cette coloration fait apparaître les noyaux en violet et le cytoplasme acidophile en bleu-gris. Ces étalements permettent entre autres de vérifier la qualité des préparations cellulaires avant l'acquisition d'images en 2D.

Pour la **microscopie à épi-fluorescence**, les observations étaient réalisées soit sur lame (grâce à l'utilisation de coverslips) soit directement en plaque de culture, sur cellules vivantes ou fixées, traitées ou non, marquées ou non selon les conditions expérimentales. L'appareillage utilisé était un microscope à épi-fluorescence inversé IX81 (Olympus, Tokyo, Japan) avec une plateforme motorisée en XYZ, utilisant le logiciel Cell[^]P (Cell Imaging, Hamburg, Germany).

Cette méthode d'analyse nous a permis de réaliser tous les essais préliminaires de contact macrophages/particules, ainsi que les premières mises au point concernant les différents marqueurs fluorescents utilisés les membranes cellulaires, les lysosomes et le cortex d'actine.

Les images de microscopie à épifluorescence ont été obtenues grâce à l'utilisation de différents filtres : pour le FITC vert (excitation entre 460 et 495 nm, émission entre 510 et 550 nm) et pour la Cy3 rouge (excitation entre 485 et 585 nm, émission entre 535 et 685 nm). Les images correspondant aux émissions de fluorescences sont superposées à celles des cellules, obtenues en lumière blanche.

Enfin, des essais ont été réalisés en **vidéomicroscopie** sur un appareillage de type Axio Observer équipé du logiciel AxioVision (station ZEISS, acquisition en 2009).

La **microscopie confocale** et la **microscopie électronique** ont été quant à elles beaucoup plus utilisées et nécessitent de plus amples explications.

II.1 Microscopie confocale

Au cours de ces travaux de thèse, les analyses de microscopie confocale ont été effectuées dans deux lieux distincts :

- Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique (CMCM), Pôle optique et vision de l'Université Jean Monnet, Saint-Etienne, équipé d'un microscope confocal TCS SP2 AOBS Leica.
- Centre commun de quantimétrie cellulaire (CCQ) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, équipé d'un microscope confocal spectral Leica TCS-SP2.

En microscopie à fluorescence conventionnelle ou épifluorescence, un volume relativement large de l'échantillon est illuminé par une lampe à vapeur de mercure produisant ainsi la plupart des longueurs d'onde de l'ultraviolet à l'infrarouge en passant par le visible. Le principe est d'illuminer l'échantillon à une longueur d'onde absorbée par le fluorochrome et de ne recueillir que la lumière correspondant à la fluorescence réémise grâce à des filtres et à des miroirs spécifiques. Ce type de microscopie présente deux inconvénients majeurs en biologie :

- Les molécules de fluorochrome présentes en dehors du plan de mise au point sont également excitées et émettent de la lumière qui vient troubler l'image et diminuer le contraste et la résolution spatiale. L'émission de fluorescence défocalisée se superpose à l'image du plan focal créant un rendu flou de l'image finale notamment à fort grossissement.
- Pour avoir un rendu en volume, il est nécessaire d'effectuer des coupes sériées dans l'échantillon, ce qui entraîne sa destruction et représente un travail long et fastidieux.

La microscopie confocale à balayage laser (monophotonique) est une des stratégies développées pour s'affranchir de ces problèmes de fluorescence défocalisée. Elle représente une avancée technologique majeure dans l'imagerie biologique en donnant en outre aux utilisateurs les moyens d'analyser l'intérieur des objets microscopiques et de les visualiser en trois dimensions (3D).

Le principe de base de la microscopie confocale est d'éliminer la lumière défocalisée produisant ainsi une image précise, nette et d'une haute résolution. C'est la géométrie de l'optique confocale qui permet de discriminer les plans en dehors du plan focal grâce aux deux pinholes ou diaphragmes variables (**Figure 68**). La source de lumière utilisée est une source laser continue opérant dans le visible tel que les lasers Argon ou Hélium-Néon. Les lasers fournissent une intensité suffisante pour compenser la perte de lumière après le passage à travers le pinhole du détecteur.

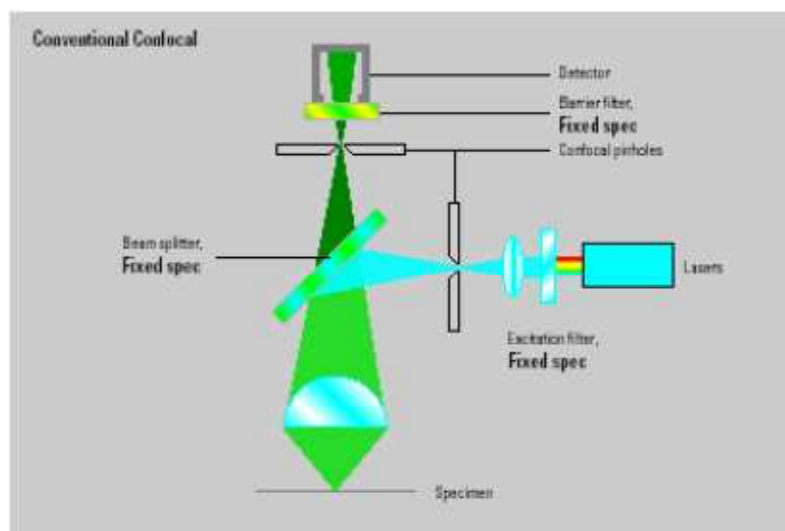


Figure 68 : Principe de la confocalité d'un microscope à balayage laser. Seule la lumière d'émission de fluorescence (beam splitter) provenant du plan focal (focus level) est collectée au niveau du détecteur (photomultiplicateur) pour constituer l'image (CMCM Stéphaneois).

Le rayon laser excitateur en passant à travers le pinhole d'excitation forme un point source lumineux qui pénètre dans l'échantillon marqué avec des fluorochromes pour former un point d'illumination bien défini spatialement. Le point d'illumination se déplace dans l'échantillon et le

balaye point par point dans les directions X et Y grâce à un scanner (miroirs galvanométriques). La lumière réfléchie émise dans l'échantillon traverse un miroir (semi transparent dichroïque) puis arrive à un système de détection par photomultiplicateurs (PMT). Devant le PMT se trouve le deuxième pinhole qui permet de sélectionner la lumière d'émission de fluorescence provenant d'un seul plan focal de la préparation, en éliminant le signal de fluorescence provenant des autres plans. L'ouverture du diaphragme/pinhole (taille du disque d'Airy) va conditionner en grande partie la qualité optique de l'image. De plus, un déplacement selon l'axe optique Z est réalisé grâce à une sur-platine (quartz piézo-électrique), faisant varier le plan de mise au point, ce qui permet d'obtenir une série de coupes optiques appelées séries en Z (**Figure 69**). Un empilement par projection de sections optiques conduit facilement à une image reconstruite en 3D montrant une distribution dans l'espace de sondes fluorescentes (**Figure 70**).

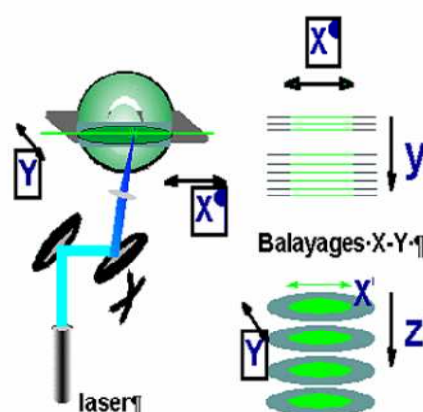


Figure 69 : Balayage point par point de l'échantillon dans les directions XY grâce à des miroirs galvanométriques et d'un déplacement selon l'axe optique Z (CMCM Stéphanois).

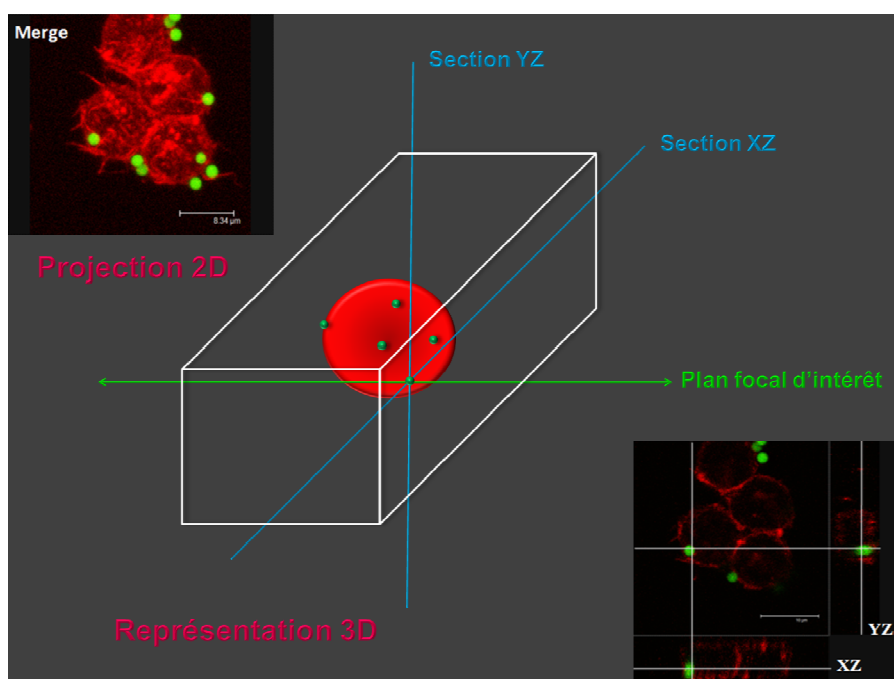


Figure 70 : Schéma explicatif des sections de plans de coupe en microscopie confocale avec l'image d'un plan focal en XZ et YZ, et d'une image moyennée finale acquise sur une série de plans de coupe.

Dans le cas de la microscopie confocale conventionnelle, on parle de régime monophotonique. Cela veut dire qu'une molécule de fluorophore n'est excitée que par un seul photon suffisamment énergétique, le laser utilisé est en mode continu.

Enfin un système de contraste interférentiel différentiel (DIC) permettait d'observer les cellules en lumière blanche et pouvait être superposé aux images des fluorescences obtenues séparément.

Par rapport à la microscopie de fluorescence conventionnelle, la microscopie confocale offre de nombreux avantages pour la localisation *in situ* d'une sonde fluorescente dans des cellules et/ou des tissus :

- Augmentation de la résolution latérale (0,2 μm) et axiale (0,4 μm).
- Elimination du signal fluorescent provenant d'autres plans grâce au pinhole, ce qui permet d'obtenir des images de haute résolution et d'une très grande netteté même à fort grossissement (**Figure 71**).
- L'acquisition de séries de sections optiques permettant la reconstruction 3D.
- La localisation simultanée de différentes sondes fluorescentes. Chaque fluorophore est enregistré dans un canal puis les différentes images obtenues sont superposées pour n'obtenir qu'une image.

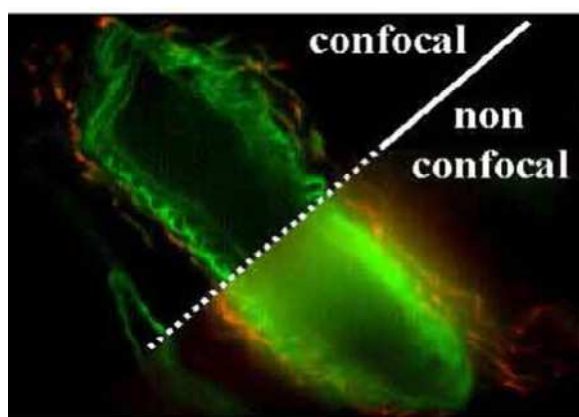


Figure 71 : Différence de netteté entre une image confocale et non-confocale (CMCM Stéphanos).

La microscopie confocale à balayage laser monophotonique présente cependant aussi un certain nombre d'inconvénients :

- Le problème de l'observation de cellules vivantes : la puissance de la source laser est trop importante au plan focal et entraîne une photo dégradation rapide de la sonde fluorescente (photobleaching) auquel s'ajoute un photodommage cellulaire irréversible qui modifie et altère le métabolisme cellulaire. C'est une des raisons pour laquelle les spécimens sont souvent fixés et montés entre lame et lamelle.
- La limitation de la profondeur d'analyse : les applications restent limitées à des échantillons de faible épaisseur (< 200 μm). En effet, la profondeur de pénétration liée à l'illumination laser visible en mode continu reste très insuffisante pour espérer analyser des phénomènes biologiques au niveau d'échantillons épais.

Afin de mieux appréhender les analyses effectuées au cours de ces travaux, il est nécessaire de rappeler quelques généralités sur le phénomène de fluorescence. La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule (généralement par absorption d'un photon) immédiatement suivie d'une émission spontanée. Une molécule fluorescente (fluorophore ou

fluorochrome) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve alors généralement dans un état électroniquement excité, souvent un état singulet, que l'on note S_0 . Le retour à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières : soit par fluorescence, soit par phosphorescence (**Figure 72**).

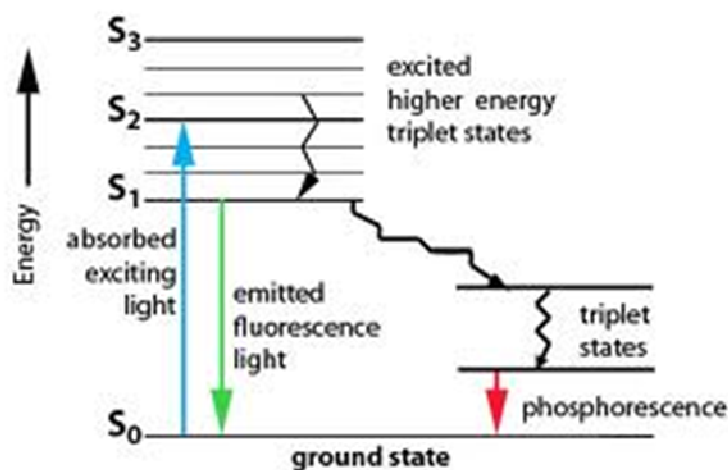


Figure 72 : Schéma explicatif de la fluorescence (CMCM Stéphanois).

La lumière réémise par la molécule excitée lors de la fluorescence peut être de même longueur d'onde (fluorescence de résonance) ou de longueur d'onde plus grande ou plus petite. Cette différence est appelée déplacement de Stokes (**Figure 73**).

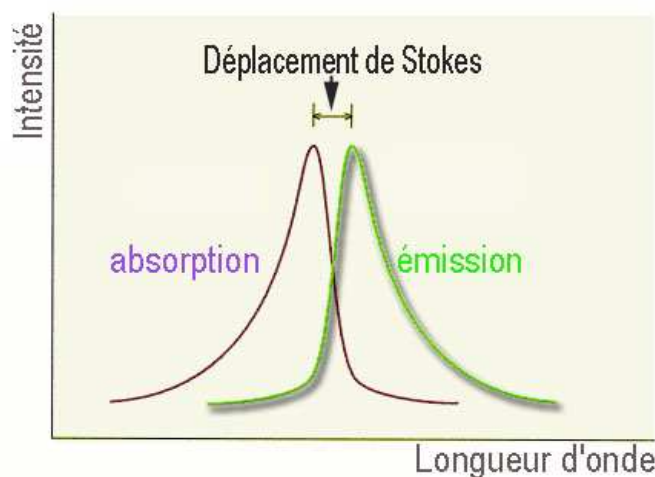


Figure 73 : Déplacement de Stokes (CMCM Stéphanois).

Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées, décrit par le déplacement de Stokes, facilite grandement la séparation et la détection de la lumière de fluorescence, signal spécifique délivré par le fluorophore. Il existe un grand choix de fluorochromes, chacun pouvant être caractérisé par ses spectres d'excitation et d'émission. Le principe de fluorescence est utilisé, dans les microscopes à fluorescence et les spectrofluorimètres.

Il est important de noter qu'au cours de cette thèse, un soin tout particulier a été accordé aux choix des molécules fluorescentes pour éviter tout chevauchement de spectres qui entacheraient les analyses. Les fluorochromes ont été choisis de façon à ce que leurs spectres d'émission et de réabsorption ne se superposent pas avec la fluorescence des particules. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des principaux composés fluorescents utilisés sont résumées dans le **Tableau 9**.

		Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
Particules	Microparticules P	488	499-540
	Microparticules I		
	Microparticules S		
	Nanoparticules FITC	488	495-550
	Nanoparticules FITC/pHrodo		
Fluorophores		532	560-650
	PKH 26	551	567
	Lysotracker®Red	577	590
	AlexaFluor®594 phalloidin	543	615-693
	Hoechst	350	408-443

Tableau 9 : Principaux composés fluorescents utilisés avec leur longueur d'onde d'excitation et d'émission.

II.2 Microscopie électronique

Au cours de ces travaux, des observations MEB et MET ont été réalisées dans différents lieux :

- Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, équipée d'un MEB FEG (Field Emission Gun = Canon à émission de champ), modèle JSM 6500 F de marque Jeol.
- Centre de Microscopie Electronique Stéphanois (CMES, Faculté de Médecine, Université Jean Monnet, Saint-Etienne), équipé d'un MEB (Hitachi S-3000N) et d'un MET (Hitachi H800-3, 200 Kvolt).

II.2.1 Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Aujourd'hui, la microscopie électronique à balayage est utilisée dans des domaines allant de la biologie à la science des matériaux, et un grand nombre de constructeurs proposent des appareils dont la résolution se situe entre 0,4 nm et 20 nm.

Concernant le principe d'un MEB, une sonde électronique (« canon à électrons ») génère un faisceau d'électrons qui est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des électrons rétrodiffusés et secondaires qui sont accélérés vers un détecteur qui amplifie le signal. A chaque point d'impact correspond un signal électrique.

L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

Des bobines disposées selon les deux axes perpendiculaires à l'axe du faisceau et parcourues par des courants synchronisés permettent de soumettre la sonde à un balayage. Les lentilles électroniques, qui sont généralement des lentilles magnétiques et les bobines de balayage forment un ensemble que l'on appelle la colonne électronique. Un MEB est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique, dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions et de détecteurs permettant de capter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon (**Figure 74**). En outre l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompes à vide.

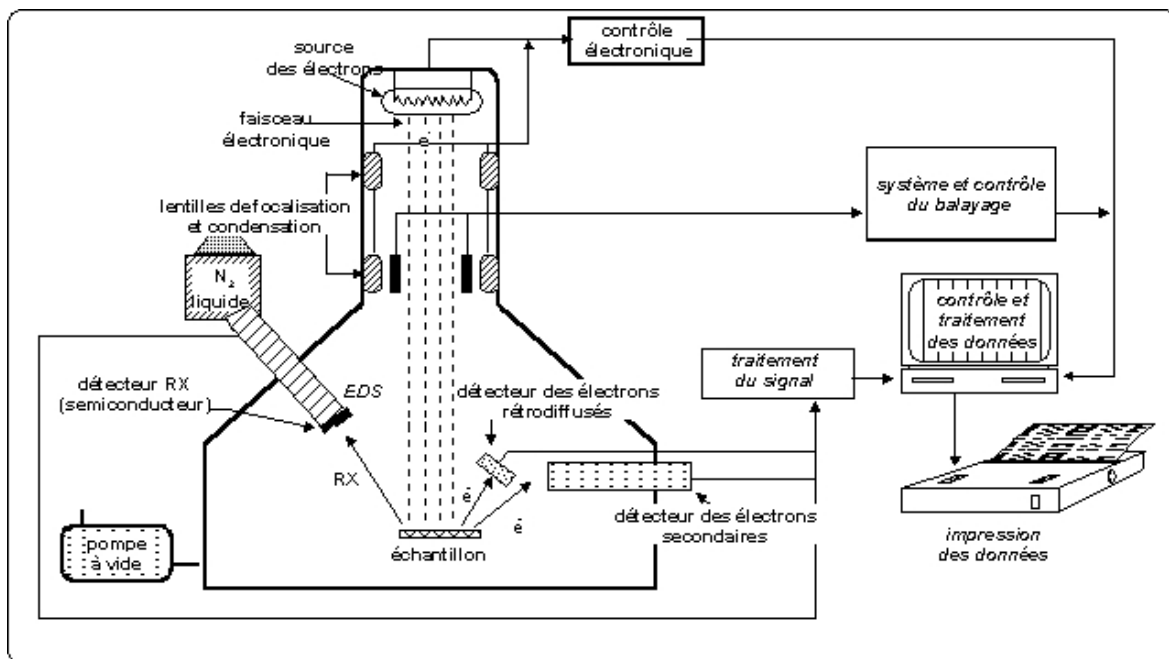


Figure 74 : Schéma du principe d'un Microscope Electronique à Balayage (Irmh).

Sous l'impact des électrons, l'échantillon émet en réponse plusieurs types de rayonnements correspondant à plusieurs phénomènes :

- Les électrons secondaires sont les électrons du faisceau incident qui ont une pénétration très faible. Ils sont transformés en signal électrique servant à moduler le faisceau d'un tube d'oscilloscope dont le balayage est synchrone avec le faisceau incident. L'image est retransmise point par point et ne devient complète qu'après une période de balayage. L'image obtenue est celle de la surface en relief de l'échantillon, jusqu'à des échelles très petites (grossissement possible jusqu'à 100 000 fois).
- Les électrons rétrodiffusés sont les électrons du faisceau incident qui ressortent après un court parcours dans l'échantillon. Leur énergie est fonction de la densité atomique de l'échantillon, l'image reconstituée comme pour les électrons secondaires donne alors une idée de la répartition des masses atomiques dans l'échantillon.

- Les photons X sont des radiations caractéristiques émises par les atomes constituant l'échantillon. Ils présentent un spectre énergétique composé d'un spectre continu et d'un spectre de raies caractéristiques des éléments de l'échantillon placé sous le faisceau. L'épaisseur de la zone d'émission de photons X sous l'impact du faisceau est d'environ 1 μm . Le système de détection, placé près de la zone d'impact, donne un signal proportionnel à l'énergie du photon X détecté. Ce signal, amplifié et digitalisé, est appliqué à l'entrée d'un analyseur multicanal.

Ainsi, la MEB est une technique d'imagerie qui permet diverses analyses physiques et chimiques de nombreux types d'échantillons comme par exemple des matériaux.

Concernant les échantillons biologiques, leur nature plus ou moins molle et la présence d'eau conduit à la nécessité d'une préparation plus attentive qui vise à les déshydrater et les rendre conducteurs. Pour cela, ils doivent donc subir une préparation spécifique en plusieurs étapes. L'étape de fixation vise à conserver les structures de l'échantillon dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. Elle est suivie d'une étape de déshydratation. En effet, la pression dans la chambre d'observation est très faible et les molécules d'eau contenues dans l'échantillon risqueraient de détruire les cellules en s'évaporant ou de polluer la chambre d'observation. Suivant la nature de l'échantillon biologique, différentes techniques comme le contournement du point critique ou la déshydratation chimique existent. L'échantillon est alors rendu conducteur grâce à une dernière étape de métallisation et peut être observé.

II.2.2 Microscope électronique à transmission

Pour la microscopie électronique à transmission (MET ou TEM pour Transmission Electron Microscopy), les analyses sont effectuées grâce aux électrons diffractés à travers l'échantillon, ce qui entraîne des contraintes comme l'utilisation d'échantillons ultra-minces (épaisseur de l'ordre de 100 nm) afin d'être le plus possible transparent aux électrons. Tout échantillon aminci à partir de l'état massif ou préparé par évaporation, et compatible avec l'ultravide (vide limite inférieur à 10^{-7} hPa) peut être analysé par MET (polymères, métaux, échantillons biologiques, etc.). Tout comme pour la MEB, la préparation des échantillons biologiques pour la MET nécessite le plus grand soin et différentes étapes (fixation, déshydratation et augmentation du contraste, inclusion en résine, coupes ultrafines puis observation).

L'intérêt premier de la microscopie électronique en transmission est l'obtention d'informations morphologiques et ultrastructurales notamment intracellulaire. Une microanalyse chimique de la zone observée est également possible avec des techniques comme la perte en énergie des électrons (Electron Energy Loss Spectroscopy) et la spectrométrie X dispersive en énergie (Energy Dispersive X-ray Spectrometry) ou en longueur d'onde (Wavelength Dispersive X-ray Spectrometry). Quelques exemples d'application concernent la mesure d'épaisseurs de couches dans un empilement, l'étude de la répartition de charges dans une matrice organique, la détermination de la nature chimique de phases ou encore l'analyse cristallographique d'un échantillon cristallin (orientation cristalline et étude des défauts structuraux).

Le principe de la MET est basé sur un faisceau d'électrons qui est focalisé sur la préparation à observer par l'intermédiaire de lentilles électromagnétiques. Les interactions entre les électrons incidents et l'échantillon sont résumées dans la **Figure 75**.

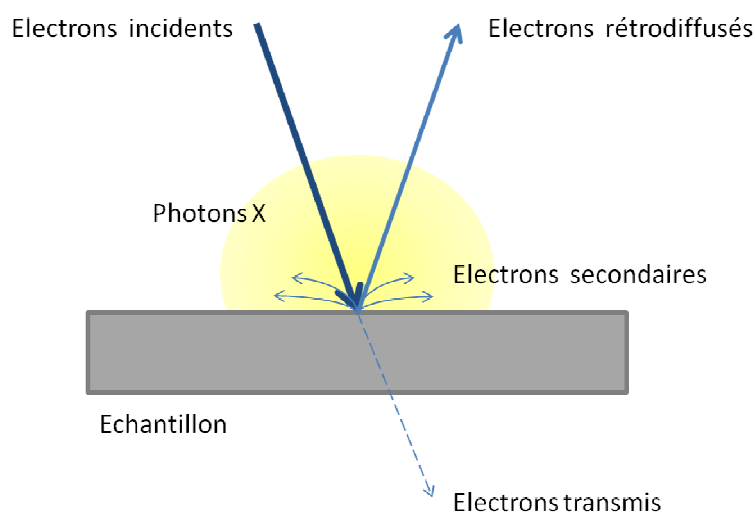


Figure 75 : Schéma des interactions faisceau d'électrons-matière (Klein, 2011).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les rayons X sont utilisés en microanalyse, les électrons secondaires et rétrodiffusés en MEB. Dans le cas de la MET, seuls les électrons traversant la préparation sont analysés. On distingue à la sortie de l'échantillon trois types d'électrons :

- Les électrons transmis n'ayant pas interagi avec l'échantillon.
- Les électrons diffusés élastiquement (sans perte d'énergie) résultant de l'interaction des électrons incidents avec les atomes de l'échantillon. Dans le cas où ce dernier est cristallin, les électrons sont diffractés par les plans réticulaires selon la loi de Bragg.
- Les électrons diffusés inélastiquement (avec perte d'énergie) provenant de l'interaction des électrons incidents avec les cortèges électroniques des atomes de l'échantillon.

La distinction entre les électrons transmis et les électrons diffusés permet de créer le contraste des images en MET.

II.3 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) permet de mesurer différents paramètres sur des cellules en suspension dans un liquide, alors qu'elles défilent une à une, à grande vitesse devant une source lumineuse. Cette technique présente le double avantage d'être à la fois analytique et quantitative. Elle se caractérise par :

- La possibilité de mesurer individuellement et simultanément plusieurs paramètres sur chaque cellule au sein d'une population hétérogène. Elle définit donc la variation et la distribution de la propriété étudiée dans la population, permettant l'identification de sous-populations et l'estimation de la population moyenne.
- La rapidité (10.000 cellules/s, voire 30 à 40.000/s pour les appareils les plus récents) et la sensibilité d'analyse (100 déterminants antigéniques par cellule), permettent de caractériser des sous-populations inaccessibles par d'autres techniques : des types cellulaires de fréquence comprise entre 10^{-3} et 10^{-6} peuvent être analysés sans enrichissement préalable.
- La possibilité de séparer physiquement chaque élément analysé selon les propriétés mesurées pour faire des études fonctionnelles sur les sous-populations ainsi obtenues (fonction cytomètre analyseur trieur).

Concernant le principe de cette technique (**Figure 76**), la suspension cellulaire à analyser est injectée sous pression au centre d'une gaine liquide pressurisée, les cellules vont ainsi être hydrodynamiquement contraintes de s'y centrer et vont ensuite individuellement traverser le faisceau laser focalisé sur l'axe du jet. Les méthodes de mesure sont basées sur l'absorption et la diffusion du rayon laser par la cellule, la fluorescence émise par les fluorochromes fixés, et la forme du signal détecté.

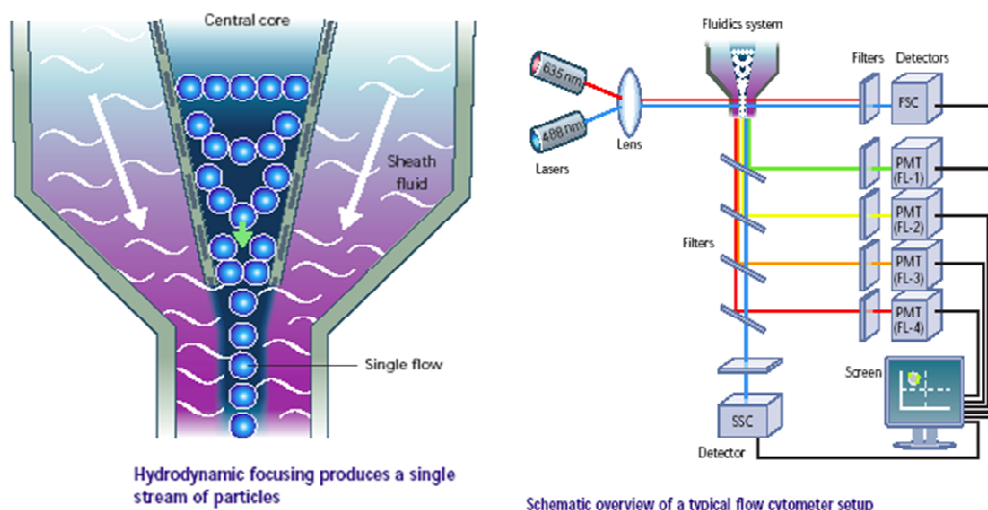


Figure 76 : Principe de la cytométrie en flux. Focalisation hydrodynamique des objets grâce au système fluidique. Schéma du trajet optique emprunté par les différents lasers (CCCF Stéphanois).

Après interception de la lumière incidente, la cellule réémet dans diverses directions une partie de la lumière reçue sous forme de signaux représentatifs de :

- ses propriétés physiques : taille et granulosité (cas de la lumière diffusée aux petits angles et à 90°) comme le montre la **Figure 77**.
- ses propriétés biologiques liées à l'émission de fluorescence par un ou plusieurs fluorochromes préalablement fixés par la cellule, l'intensité de chaque signal sera donc corrélée avec des propriétés cellulaires.

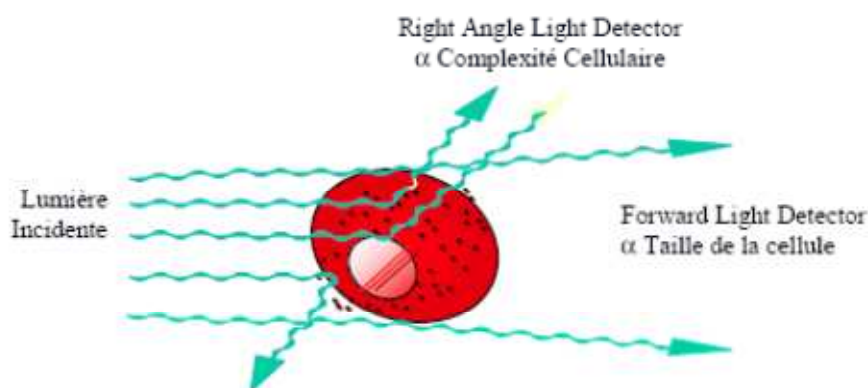


Figure 77 : Schéma explicatif des paramètres détectables en CMF (CCCF Stéphanois).

Les signaux émis sont focalisés, séparés par une alternance de miroirs et de filtres optiques, en fonction de leur longueur d'onde. Ils sont ensuite amplifiés et transformés en impulsions électriques par les photomultiplicateurs puis digitalisés pour être utilisés par l'unité informatique qui les représentera sous différentes formes :

- Monoparamétrique (histogramme) où l'abscisse représente l'amplitude du paramètre (exprimée en unités arbitraires ou canaux) et l'ordonnée, le nombre d'événements par canal.
- Biparamétrique : corrélation de deux paramètres mesurés.

Pour chaque représentation les statistiques correspondantes sont établies automatiquement : nombre et pourcentage de cellules au sein d'une population donnée, mesure de l'intensité et de la moyenne de fluorescence, d'où l'aspect quantitatif et qualitatif de la technique. La définition d'une fenêtre d'intérêt autour d'une sous-population, que ce soit sur la morphologie et/ou sur la fluorescence, permettra grâce à l'informatique d'analyser d'autres paramètres sur cette sous-population et la détection d'événements rares. Les paramètres mesurables par cette technique sont nombreux, car dès qu'il est possible de rendre fluorescente une population cellulaire de façon spécifique, son analyse est réalisable par CMF.

Les applications peuvent être divisées en deux groupes :

- Analyse de constituants ou compartiments cellulaires : ADN, ARN, protéines, expression d'antigènes (membranaires ou intracellulaires), enzymes, hormones.
- Analyse d'activités cellulaires fonctionnelles : réponse précoce à une stimulation cellulaire (modification du pH, du Ca^{++}), métabolisme oxydatif, potentiel membranaire.

Cette technique offre de multiples possibilités d'analyse mais elle nécessite une population de cellules parfaitement dissociées, en bon état et en nombre suffisant pour effectuer les contrôles et réglages indispensables à la fiabilité et à la reproductibilité des mesures. Par contre elle ne permet

pas de visualiser la morphologie de la cellule, à la différence des techniques microscopiques d'où la complémentarité de ces outils (*Tableau 10*).

	Cytométrie en flux	Microscopies
Quantification	+++	+ / -
Discrimination	Individuelle	Individuelle
Visualisation	-	+++
Photo-éblouissement	-	+++
Reproductibilité	+++	+
Evenements observés	-	Quelques centaines
Tri sur cellules vivantes	+++	+ / -
Complémentarité	oui	oui

Tableau 10 : Comparatif des avantages et inconvénients de la CMF par rapport aux techniques de microscopie.

Le Centre Commun de Cytométrie en Flux (CCCF, Faculté de Médecine, Université Jean Monnet, Saint-Etienne) avec lequel nous avons travaillé, comprend un cytomètre analyseur-trieur FACS DiVa (Fluorescence Activated Cell Sorter DIgital VAntage, BD Biosciences) équipé de deux lasers (Coherent/Argon et Spectra Physics/HeNe) émettant trois raies : 488nm (vert), 633nm (rouge) et 351nm (UV), du module d'acquisition digitale DiVa, un système de tri sur plaque et sur lame, tri quatre voies (Quadrasort TM) et du tri haute vitesse (Turbo SortTM). Six paramètres de fluorescence peuvent être simultanément analysés en plus de deux détecteurs de diffusion pour la morphologie cellulaire : FSC (forward scatter/taille) et SSC (side scatter/complexité).

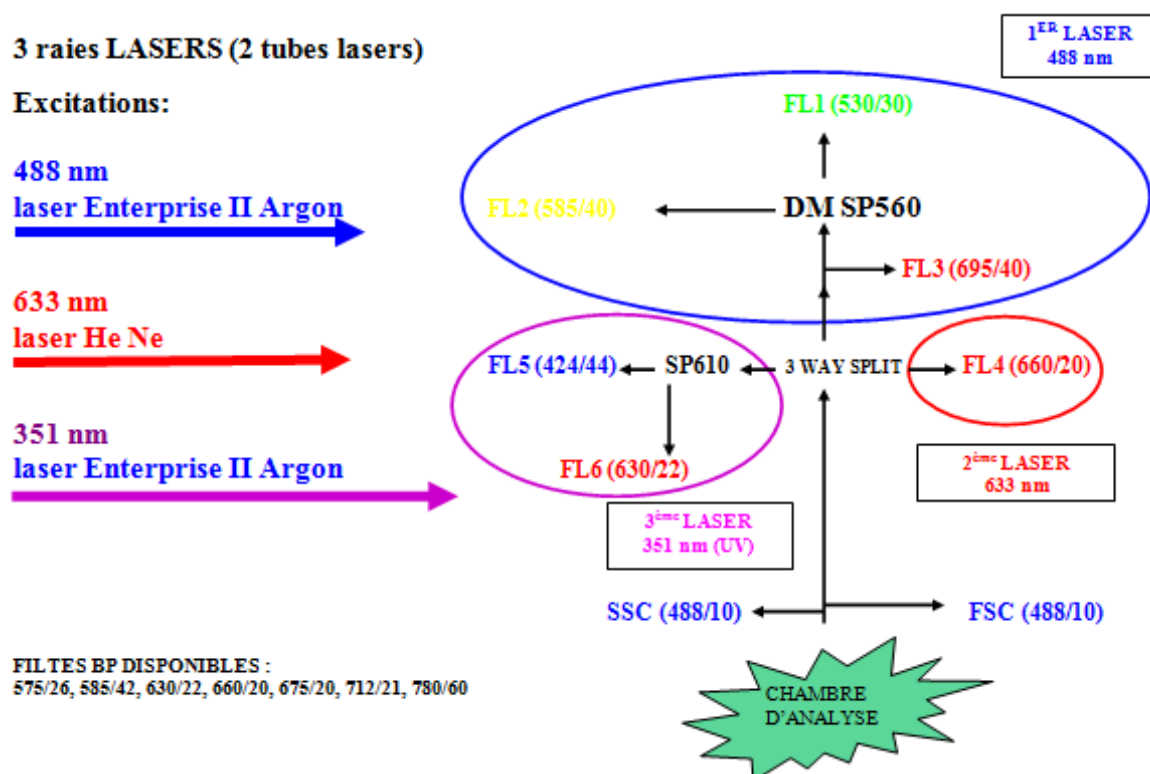


Figure 78 : Chemin optique du cytomètre du CCCF de Saint-Etienne (CCCF Stéphanois).

II.4 Physico-chimie des particules : taille et potentiel zêta

II.4.1 Diffusion dynamique de la lumière

La technique de diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering – DLS) permet de mesurer des diamètres de particules en suspension pouvant descendre jusqu'à 3 nm.

Lorsqu'une solution colloïdale est traversée par un faisceau de lumière focalisé et monochromatique, les particules dispersent une partie de ce faisceau dans toutes les directions. L'intensité du faisceau dispersé fluctue en fonction du temps en raison du mouvement brownien des particules qui a pour conséquence une variation de la distance entre les particules. Grâce à un photomultiplicateur, l'appareil détecte les photons et analyse les fluctuations d'intensité pour donner les coefficients de diffusion des particules (**Figure 79**). Ces coefficients sont finalement transformés en diamètre hydrodynamique à l'aide de la relation du déplacement brownien de particules sphériques donnée par l'équation de Stokes-Einstein (**Figure 80**).

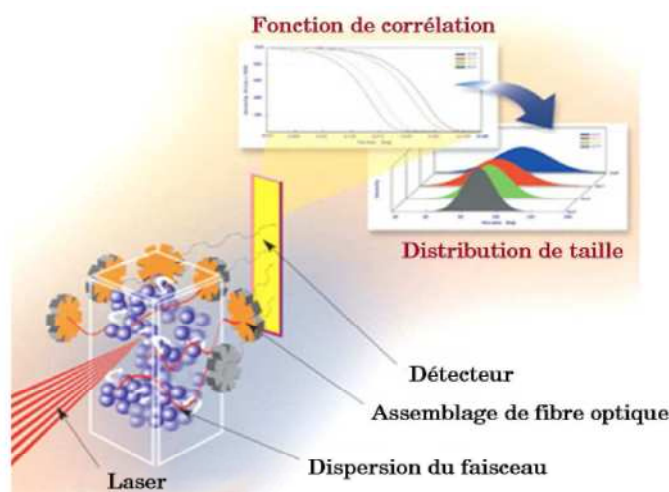


Figure 79 : Principe de la technique de diffusion dynamique de la lumière (ujkeb.com).

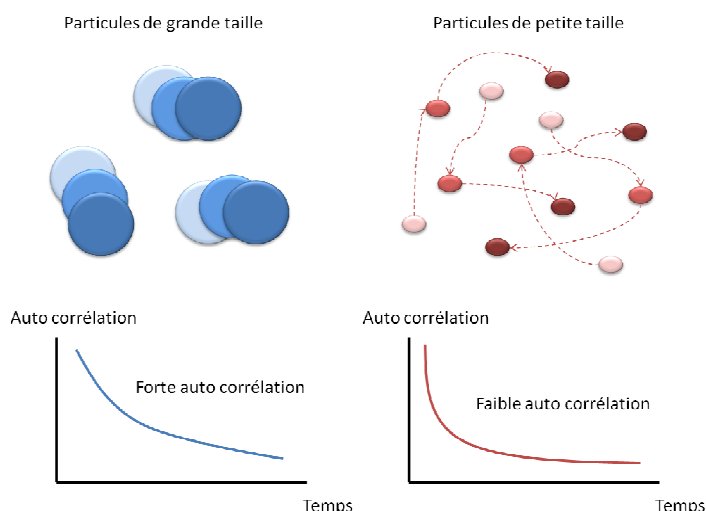


Figure 80 : En DLS, la courbe d'auto corrélation créée à partir des variations d'intensité du signal permet d'obtenir des informations sur le mouvement des particules et ainsi d'en déduire leur taille (Klein, 2011).

L'Ecole des Mines de Saint Etienne dispose de deux appareils basés sur ce principe de DLS : un ZetaSizer nano S (Malvern) et un NanoQ de chez Cordouan. Chaque appareil utilise un logiciel spécifique relié à l'ordinateur donnant directement le pourcentage de particules en intensité mesurée par classe de taille. En considérant que les particules sont sphériques, il calcule ensuite le pourcentage en volume et en nombre.

Ce type d'appareillage permet aussi d'évaluer le potentiel zêta.

II.4.2 Le potentiel zêta

La zétamétrie est une technique permettant de mesurer le potentiel de surface, dit potentiel zêta de particules en suspension et ainsi de caractériser la stabilité de ces suspensions en fonction de différents paramètres (pH, concentrations en ions, etc.).

Le potentiel zêta (ζ) représente la charge que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution. En général, une particule est chargée négativement et une couche fixe d'ions positifs l'entoure. En s'éloignant, dans une couche diffuse, le potentiel varie pour atteindre la neutralité dans la masse de la solution. Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique de la particule en suspension c'est à dire au niveau du plan de cisaillement (limite entre la partie de la solution qui se déplace avec la particule et celle qui se déplace sans la particule) comme le montre la **Figure 81**. En pratique, plus il est élevé en valeur absolue, plus la charge de la particule s'intensifie (négativement lorsque le potentiel zêta est négatif et inversement) ce qui offre aux particules leur stabilité en dégageant un effet répulsif lorsque deux particules s'approchent l'une de l'autre. A l'inverse, au fur et à mesure qu'il diminue en valeur absolue, les particules deviennent de moins en moins chargées et peuvent donc s'approcher les unes des autres plus étroitement. Cela accroît les probabilités de collision et donc a pour conséquence une perte de stabilité. Par conséquent, le potentiel zêta est un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité colloïdale. Ainsi, on considère qu'une suspension est stable lorsque son $\zeta > 30$ mV.

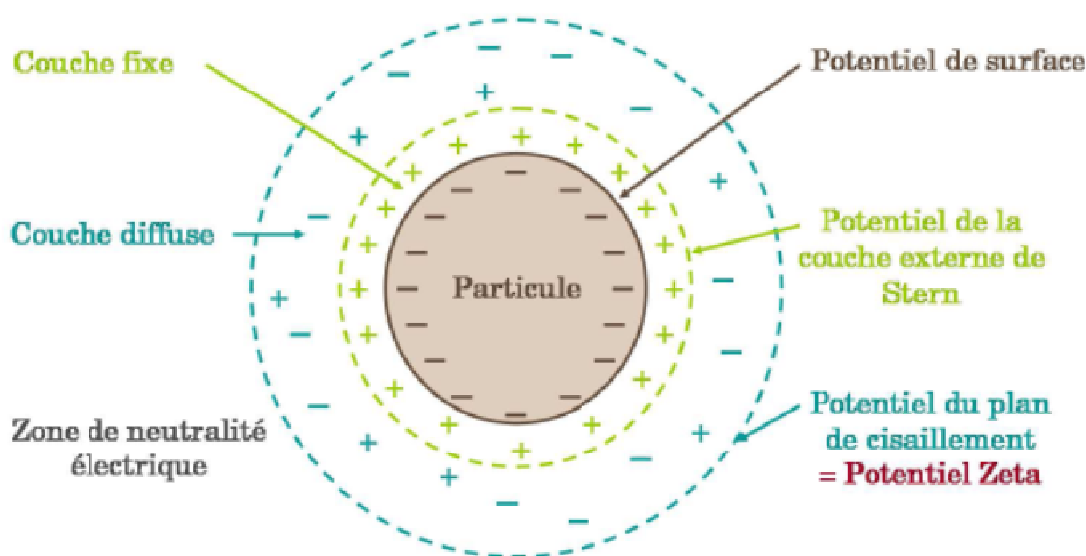


Figure 81 : Charge et potentiels électriques d'une particule dont le potentiel zêta (Simon-Deckers, 2008).

Certains paramètres influencent le potentiel zêta, le principal étant le pH. En effet lorsque celui-ci est acide les particules tendent à acquérir des charges positives et lorsque celui-ci est basique les particules tendent à acquérir des charges négatives. On définit alors un pH pour lequel la particule a un potentiel zêta nul : le point isoélectrique (pI). D'autres paramètres peuvent jouer sur la valeur du potentiel zêta. Par exemple l'épaisseur de la couche diffuse, qui est directement corrélée à l'intensité du potentiel zêta, est régie principalement par la concentration en électrolytes de la solution et par la valence des ions présents.

II.5 Nanotoxicologie *in vitro*

La toxicité des particules sur les macrophages *in vitro* a été analysée pour un ensemble de paramètres non restreint à une évaluation de la viabilité. Que ce soit pour le modèle de particules micrométriques ou le modèle de nanoparticules, les techniques restent les mêmes et nous allons dans ce paragraphe présenter la méthodologie expérimentale employée pour l'évaluation de la toxicité biologique de nos particules d'intérêt.

Au préalable de ces analyses, des observations morphologiques ont été effectuées après cytocentrifugation sur lame et coloration MGG comme décrit précédemment.

II.5.1 Cytotoxicité

La LDH (Lactate Déshydrogénase) est une enzyme présente dans le cytoplasme des cellules vivantes. En cas de perte d'intégrité membranaire (lyse de la membrane plasmique par un agent toxique par exemple), la LDH est libérée dans le milieu. Le dosage de la LDH permet de quantifier la cytotoxicité, car c'est un témoin indirect de la mort cellulaire. Ce test consiste ainsi à déterminer la quantité d'enzyme libérée dans le milieu. Pour ce faire nous allons mesurer l'activité de la LDH du surnageant de culture après un temps de contact des particules avec les cellules fixé à 24 heures.

L'hydrolyse du lactate en pyruvate par la LDH conduit à la formation de pouvoir réducteur $\text{NADH} + \text{H}^+$. Ce pouvoir réducteur est ensuite utilisé comme réactif limitant d'une réaction catalysée par une seconde enzyme appelée la diaphorase. Cette enzyme catalyse une réaction colorimétrique, en transformant son substrat (Resazurin) en un composé fluorescent (Resorufin). Ainsi d'après les deux réactions mises en jeu la fluorescence mesurée est proportionnelle à l'activité de la LDH du milieu (**Figure 82**). Les échantillons seront donc analysés par fluorimétrie.

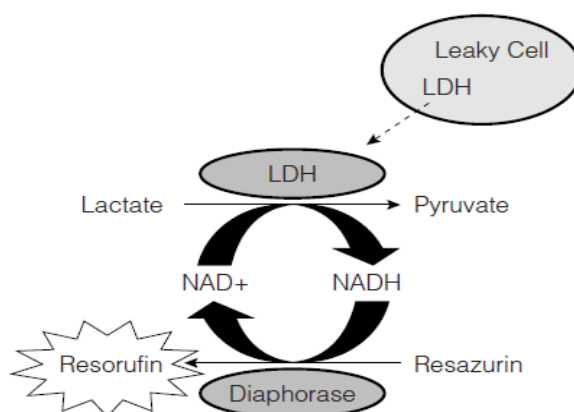


Figure 82 : Principe du dosage de la LDH (Promega).

Pour cela les macrophages sont incubés avec les particules (1×10^5 macrophages/puits en plaque 96 puits) dans leur milieu biologique à 37°C sous 5% de CO₂. Après 24 heures d'incubation le surnageant est prélevé et testé avec un kit de dosage commercial (CytoTox-ONE™ - Homogeneous Membrane Integrity Assay - Promega). Les résultats obtenus en fluorimétrie (530/590 nm) sont exprimés en pourcentage de LDH libérée par rapport au témoin négatif.

II.5.2 Réaction inflammatoire

Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) est une cytokine, sécrétée par les macrophages. Il joue un rôle clé d'indicateur du niveau de l'inflammation et de la réponse immunitaire des cellules. Il reflète l'état d'activation macrophagique et la phase aigüe de la réponse inflammatoire (**Feghali and Wright, 1997**).

Les macrophages sont incubés 24 heures avec les particules dans leur milieu biologique puis le TNF- α présent dans le surnageant va être quantifié grâce à une technique de dosage immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (**Figure 83**).

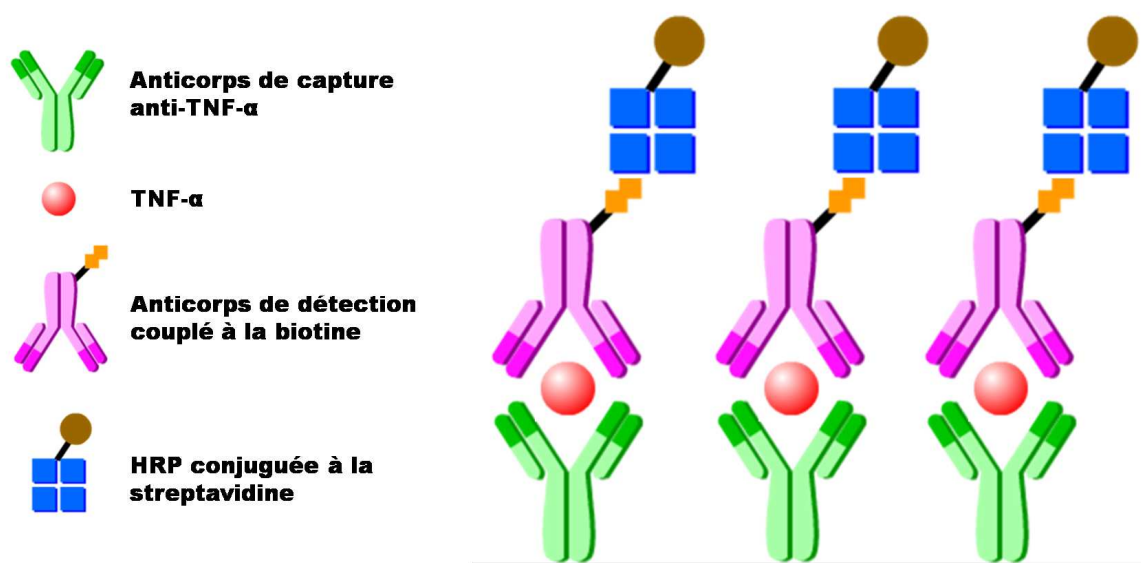


Figure 83 : Principe du dosage ELISA du TNF- α .

Nous avons utilisé un kit de chez R&D Systems (Quantikine® Mouse TNF- α) dans lequel un anticorps polyclonal spécifique pour le TNF- α est préfixé au fond des puits de la plaque au format 96 puits. Nous avons utilisé pour cette technique 50 μ L de surnageant de culture. Après incubation pendant deux heures, les puits sont lavés avec la solution de lavage et un anticorps de détection anti TNF- α conjugué à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxydase) est ajouté à chaque puits puis incubé une nouvelle fois pendant deux heures. Après lavages, une solution substrat (peroxyde d'hydrogène et tétraméthylbenzidine) permettant une réaction colorée avec la HRP est ajoutée et incubée pendant 30 minutes. Les puits vont alors se colorer en bleu de façon proportionnelle à la concentration en TNF- α présente. L'ajout de la solution stop (acide hydrochlorique) va entraîner un changement de couleur du bleu vers le jaune. L'absorbance peut alors être mesurée par spectrophotométrie à 450 nm. Les résultats sont calculés en pg/mL grâce à une courbe d'étalonnage de l'activité du TNF- α réalisée en parallèle.

II.5.3 Stress oxydant global

L'OxiSelect™ ROS Assay Kit (Euromedex) permet de mesurer l'activité des hydroxydes, peroxydes et autres espèces oxygénées réactives (ROS) dans les cellules. Cet essai utilise une sonde fluorogénique perméable aux cellules, le 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Une fois que le DCFH-DA a pénétré dans les cellules, il est déacétylé par des estérases cellulaires en 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) non fluorescent, lui-même rapidement oxydé en 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) fluorescent par les ROS comme le montre la **Figure 84**.

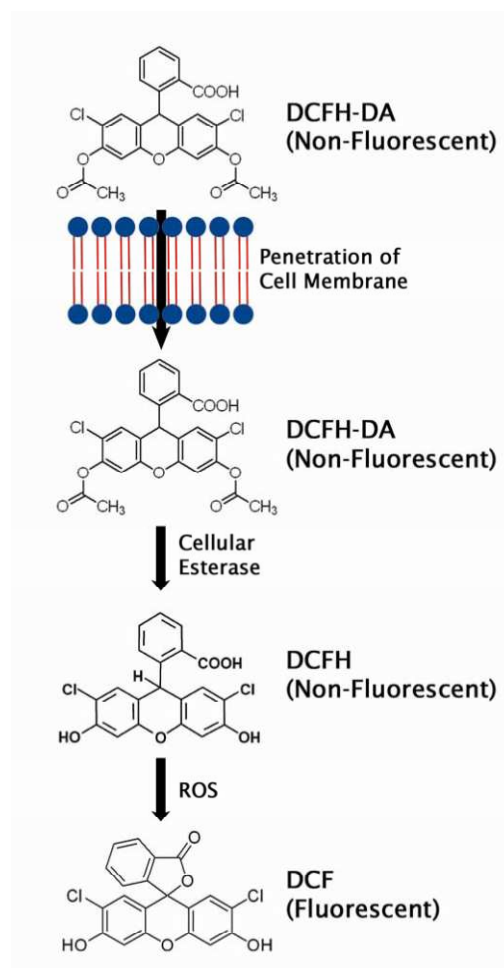


Figure 84 : Principe de l'essai « OxiSelect » (Euromedex).

L'intensité de fluorescence mesurée par fluorimétrie (480/530 nm) est proportionnelle au niveau de ROS présent dans le cytosol des cellules. Pour cela les macrophages sont incubés dans leur milieu de culture à 37°C sous 5% de CO₂ 24 heures avec les nanoparticules. Le contenu de ROS dans les échantillons (nM/h) est évalué en comparaison avec une courbe standard de DCF prédéterminée.

II.5.4 Stress oxydant spécifique aux H₂O₂

L'évaluation de ce paramètre a pour but de mesurer la production spécifique d'un type de radicaux libres induit par le contact avec les particules. Ce stress conduit à la formation d'un oxydant puissant, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (principale substance du pouvoir oxydant des cellules). Le peroxyde d'hydrogène est en effet une substance produite par la cellule au cours de la réponse cellulaire.

Le dosage « ROS aiguë » permet de déterminer la production de H₂O₂ due au stress cellulaire. Dans des conditions expérimentales définies, le dosage « TOX chronique » permet de déterminer la capacité de production maximale en H₂O₂ par les cellules. La mise en parallèle de ces deux valeurs permet d'évaluer un niveau de stress cellulaire. Ce paramètre sera évalué dans deux conditions différentes de contact court ou long avec les nanoparticules de façon à reproduire les conditions d'un stress oxydant aiguë ou chronique.

Protocole du dosage « ROS aiguë »

Pour évaluer ce paramètre, les macrophages sont incubés dans leur milieu de culture à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 90 minutes avec les nanoparticules. Durant la période de contact, le peroxyde d'hydrogène libéré est mesuré comme décrit en 1985 (**De la Harpe and Nathan, 1985**) selon la méthode d'oxydation de la scopolétine catalysée par l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxidase). La scopolétine est mesurée après 90 minutes de contact entre les cellules et les particules par fluorescence (355/460 nm). Les résultats sont obtenus en nmol de H₂O₂/10⁶ macrophages.

Protocole du dosage « TOX chronique »

Le dosage TOX permet de déterminer la capacité de production maximale de H₂O₂ par les cellules. Les cellules sont donc incubées avec les nanoparticules pendant 24 heures dans leur milieu de culture à 37°C sous une atmosphère de 5% CO₂. La libération du peroxyde d'hydrogène est stimulée en outre par l'addition de 100 ng/mL de PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma). La quantité de peroxyde d'hydrogène libérée est mesurée par la même méthode que précédemment. Les résultats sont donnés en pourcentage de H₂O₂ par rapport au témoin cellules seules.

BIBLIOMETRIE PERSONNELLE

ACL : Articles dans des revues internationales ou nationales avec comité de lecture répertoriées par l'AERES ou dans les bases de données internationales

Total : 1

L. LECLERC, D. BOUDARD, J. POURCHEZ, V. FOREST, O. SABIDO, V. BIN, S. PALLE, P. GROSSEAU, D. BERNACHE, M. COTTIER.

Quantification of micro-sized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms.

Inhal Toxicol. 2010 Nov; 22(13):1091-1100. Epub 2010 Nov 3.

PMID: 21047166

L. LECLERC, D. BOUDARD, J. POURCHEZ, V. FOREST, L. MARMUSE, C. LOUIS, V. BIN, S. PALLE, P. GROSSEAU, D. BERNACHE, M. COTTIER.

Quantitative cellular uptake of double fluorescent core-shelled model nanoparticles.

Soumis à Journal of Nanoparticles Research

L. LECLERC, W. RIMA, D. BOUDARD, J. POURCHEZ, V. FOREST, V. BIN, P. MOWAT, P. PERRIAT, P. GROSSEAU, D. BERNACHE, M. COTTIER.

Size effect of fluorescent nanoparticles on uptake by macrophages and *in vitro* biological activity.

A soumettre

ACTI : Communications avec actes dans un congrès international

Total : 2

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, MARMUSE L, LOUIS C, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : International Conference on Safe production and use of nanomaterials, Nanosafe 2010, Grenoble, 16-18 novembre 2010.

Volume 304 of IOP Publishing's open access Journal of Physics: Conference Series.

L Leclerc *et al* 2011 *J. Phys.: Conf. Ser.* **304** 012055 doi: 10.1088/1742-6596/304/1/012055.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, SABIDO O, PALLE S, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative methods for phagocytosis quantification of micro-sized particles.

Poster : AFC & ESCCA 24th Annual Meeting of the Clinical Cytometry Society, Saint-Etienne, 8-12 septembre 2009.

Cytometry Part B – Clinical Cytometry, 76B(6), 429-430, 2009.

ACTN : Communications avec actes dans un congrès national

Total : 4

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Développement d'une sonde sensible au pH pour évaluer la phagocytose de nanoparticules.

Oral : Materiaux 2010, Nantes, 18 au 22 octobre 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, MARMUSE L, LOUIS C, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : 6° Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA, Espace tête d'Or Villeurbanne, 28-29 mars 2011. Bulletin du Cancer, Volume 98, supplément 1 mars 2011.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : 5° Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA, Espace tête d'Or Villeurbanne, 30-31 mars 2010. Bulletin du Cancer, Volume 97, numéro spécial mars 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, SABIDO O, BIN V, PALLE S, POURCHEZ J, GROSSEAU P, COTTIER M, BERNACHE-ASSOLLANT D.

Quantification de la phagocytose à partir de particules fluorescentes.

Poster : 4èmes Journées Scientifiques du CLARA, Archamps, 24 au 25 mars 2009. Bulletin du Cancer, Volume 96, numéro spécial mars 2009.

COM : Communications orales sans actes dans un congrès international ou national

Total : 3,5

LECLERC L, RIMA W, POURCHEZ J, BOUDARD D, FOREST V, BIN V, MOWAT P, PERRIAT P, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Size effect of fluorescent nanoparticles on uptake by macrophages and in vitro toxicity.

Communication orale (20 min) : International Conference on „Biological Responses to Nanoscale Particles“, Essen, Allemagne, 11 au 15 septembre 2011.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, FOREST V, MARMUSE L, LOUIS C, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Développement de nanoparticules sensible au pH pour évaluer la phagocytose.

Communication orale (10 min) : 16^{ème} Journées CHEC (Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytologistes et Cytogénéticiens), Rouen, 10 au 12 mars 2010. Prix jeune chercheur.

LECLERC L, POURCHEZ J, BOUDARD D.

Phagocytose de microparticules.

Communication (10 min) : 10^{ème} Journées Stéphanoise de Cytométrie en Flux, Saint-Étienne, 17 et 18 Juin 2009.

LECLERC L, BOUDARD D, SABIDO O, BIN V, POURCHEZ J, VERGNON J.M, COTTIER M.

Mise au point d'un protocole de quantification de la phagocytose de billes fluorescentes en CMF.

Communication Flash (3 min) : 13^{ème} Congrès annuel de l'AFC (Association Française de Cytométrie), Nancy, 22 au 24 octobre 2008.

LECLERC L.

Mise au point d'un protocole de quantification de la phagocytose de billes fluorescentes.

Communication (15 min) : 9^{ème} Journées Stéphanoise de Cytométrie en Flux, Saint-Étienne, 28 Mai 2008.

AFF : Communications par affiche dans un congrès international ou national

Total : 16

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, FOREST V, MARMUSE L, LOUIS C, PALLE S, BIN V, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : Journée de la recherche de l'EDSIS (Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé), Saint Etienne, 19 mai 2011.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, MARMUSE L, LOUIS C, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : 6^e Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA, Espace tête d'Or Villeurbanne, 28-29 mars 2011.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, MARMUSE L, LOUIS C, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : 16^e Journées CHEC (Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytologistes et Cytogénéticiens), Rouen, 10 au 12 mars 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : Journée scientifique de l'IFRESIS, Saint-Etienne, 24 novembre 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, MARMUSE L, LOUIS C, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : International Conference on Safe production and use of nanomaterials, Nanosafe 2010, Grenoble, 16-18 novembre 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : 11^e journées de quantimétrie cellulaire, Saint-Etienne, 16 Juin 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : Nanotoxicology 2010, Edinburgh, 2 au 4 juin 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : Journée de la recherche de l'EDSIS (Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé), Saint Etienne, 6 mai 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, PALLE S, GROSSEAU P, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : 5^e Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA, Espace tête d'Or Villeurbanne, 30-31 mars 2010.

RIMA W, MARTINI M, MOWAT P, JOLY-POTTUZ L, MALCHERE A, **LECLERC L**, POURCHEZ J, PERRIAT P, EPICIER T.

Development of Innovative Electron Microscopy Techniques to Study Nanoparticles and Biological Cells Interactions.

Journées scientifiques du cluster de recherche MACODEV, Sévrier, 22-23 mars 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, PALLE S, BERNACHE-ASSOLLANT D, COTTIER M.

Development of innovative pH sensor to evaluate phagocytosis of nanoparticles.

Poster : Seminar "Clinical applications of nanotechnologies in the field of cancer", Montpellier, 28 au 29 janvier 2010.

LECLERC L, BOUDARD D, SABIDO O, BIN V, PALLE S, POURCHEZ J, GROSSEAU P, COTTIER M, BERNACHE-ASSOLLANT D.

Quantification de la phagocytose à partir de particules fluorescentes.

Poster : STPMF 2009 (Science et Technologie des Poudres et Matériaux Frittés), Montpellier, 27 au 29 mai 2009. 978-2-9528140-1-0.

LECLERC L, BOUDARD D, SABIDO O, BIN V, PALLE S, POURCHEZ J, GROSSEAU P, COTTIER M, BERNACHE-ASSOLLANT D.

Quantification de la phagocytose à partir de particules fluorescentes.

Poster : 4^{èmes} Journées Scientifiques du CLARA, Archamps, 24 au 25 mars 2009.

LECLERC L, BOUDARD D, SABIDO O, BIN V, PALLE S, POURCHEZ J, GROSSEAU P, COTTIER M, BERNACHE-ASSOLLANT D.

Quantification de la phagocytose à partir de particules fluorescentes.

Poster : Journée scientifique IFRESIS, Saint Etienne, 18 décembre 2008.

LECLERC L, BOUDARD D, SABIDO O, BIN V, POURCHEZ J, VERGNON J.M, COTTIER M.

Mise au point d'un protocole de quantification de la phagocytose de billes fluorescentes en CMF.

Poster : 13^{ème} Congrès annuel de l'AFC (Association Française de Cytométrie), Nancy, 22 au 24 octobre 2008.

LECLERC L, BOUDARD D, POURCHEZ J, SABIDO O, PALLE S, DEBAYLE J, COTTIER M.

Development of innovative methods for phagocytosis quantification of micro-sized particles.

Poster : 2nd International Conference on Nanotoxicology, Zurich, 7 au 10 septembre 2008.

NNT : 2011 EMSE 0635

Lara LECLERC

CELLULAR UPTAKE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF FLUORESCENT MICRO- AND NANOPARTICLES WITH WELL-DEFINED SURFACE CHEMISTRY

Specialty: Process engineering

Keywords: nanoparticles, cellular uptake, physico-chemistry, biological activity.

Abstract:

Nanotechnologies are in full extension and the remarkable properties showed by nanomaterials pave the way for a variety of applications such as materials science or nanomedicine. However, this rapid expansion must be accompanied by justified interrogations about human's health risks or impact on the environment because of their potential biological toxicity. In this context, this thesis aimed at improving the understanding of the cellular internalization mechanisms of particles. Different types of fluorescent micro- and nanoparticles with well-controlled physico-chemistry (size and surface groups) were synthesized. The contacts were established with an *in vitro* macrophage cell line (RAW 264.7), which represents the first line target cells in the human defense mechanisms.

Different methodologies to accurately quantify and distinguish internalized nanoparticles from those just adhering to cell membranes were developed using flow cytometry and fluorimetry. Complementary confocal microscopy and SEM/TEM techniques were carried out to better visualize nanoparticles intracellular localization. Finally, for each experimental condition tested, the biological activity of the particles was evaluated in terms of inflammatory response, membrane alteration and oxidative stress.

Thus, the first part of this work allowed the development of a methodology to quantify fluorescent microscopic particles internalization. Then a model of double fluorescent nanoparticles sensitive to pH variations was developed in order to quantify more precisely the phagocytic process. Finally the last part aimed at evaluating the impact of the size of the nanoparticles on their internalization.

NNT : 2011 EMSE 0635

Lara LECLERC

INTERNALISATION CELLULAIRE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DE MICRO ET NANO-PARTICULES FLUORESCENTES DE CHIMIE DE SURFACE CONTROLEE

Spécialité : Génie des procédés

Mots clefs : nanoparticules, internalisation cellulaire, physico-chimie, activité biologique.

Résumé :

Les nanotechnologies sont en pleine expansion et leurs propriétés remarquables ouvrent la voie à des applications très variées intéressant la science des matériaux comme la nanomédecine. Cependant cet essor fulgurant doit s'accompagner d'interrogations justifiées sur les risques sanitaires pour l'homme et l'environnement compte tenu de leur potentielle toxicité biologique. Dans ce contexte le travail de cette thèse porte sur l'amélioration de la compréhension des mécanismes d'internalisation de particules au niveau cellulaire. Pour cela plusieurs types de micro- et nanoparticules fluorescentes de physico-chimie contrôlée (taille et groupements de surface) ont été synthétisés. Des contacts ont ensuite été établis avec une lignée cellulaire *in vitro* de macrophages (RAW 264.7) qui représente une cible préférentielle de l'organisme au niveau des moyens de défense.

Différentes méthodologies de quantification en cytométrie en flux et fluorimétrie ont été développées dans le but de distinguer précisément les nanoparticules internalisées de celles adhérentes au niveau des membranes. Des techniques complémentaires de microscopie confocale et MEB/MET ont été mises au point afin de mieux visualiser leur localisation intracellulaire. Enfin, pour nos diverses conditions expérimentales, une étude de l'activité biologique des particules a été évaluée sur la base des paramètres de réaction inflammatoire, d'altération membranaire et de stress oxydant. Ainsi, la première partie de ces travaux a concerné la mise au point d'une méthodologie de quantification de l'internalisation de particules fluorescentes microscopiques. Ensuite nous avons développé un modèle de nanoparticules doublement fluorescentes sensibles aux variations de pH permettant une quantification plus ciblée du processus de phagocytose. Enfin la dernière partie s'est attachée à étudier spécifiquement l'impact de la taille des nanoparticules sur leur internalisation.